

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1948-1949.

Série Etat N° 31

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE
LA SPÉCIFICITÉ DE LA PHYTASE

PREMIÈRE THÈSE

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT D'ÉTAT EN PHARMACIE

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

soutenues le 1949

PAR

Charles PEREZ

*Titulaire des Certificats d'Etudes supérieures de Chimie biologique appliquée
et de Microbiologie, Sérologie, Hématologie et Parasitologie.*

JURY { MM. P. FLEURY, *Président.*
G. VALETTE, *Professeur.*
J. COURTOIS, *Professeur sans chaire.*

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE M. DECLUME

1949

FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

Nom du Candidat : **PEREZ**

Prénom : **Charles**

Date de soutenance :

Numéro d'ordre :

PEREZ (Charles).

Contribution à l'étude de
la spécificité de la phytase.
— *Lons-le-Saunier, Imp. M.
Declume, 1949, in-8°, 124 p.*

(Th. Doct. Etat Pharm.,
Paris, 1949, N° 31).

PEREZ (Charles).

Contribution à l'étude de
la spécificité de la phytase.
— *Lons-le-Saunier, Imp. M.
Declume, 1949, in-8°, 124 p.*

(Th. Doct. Etat Pharm.,
Paris, 1949, N° 31).

PEREZ (Charles).

Contribution à l'étude de
la spécificité de la phytase.
— *Lons-le-Saunier, Imp. M.
Declume, 1949, in-8°, 124 p.*

(Th. Doct. Etat Pharm.,
Paris, 1949, N° 31).

PEREZ (Charles).

Contribution à l'étude de
la spécificité de la phytase.
— *Lons-le-Saunier, Imp. M.
Declume, 1949, in-8°, 124 p.*

(Th. Doct. Etat Pharm.,
Paris, 1949, N° 31).

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1948-1949.

Série Etat N° 31

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE
LA SPÉCIFICITÉ DE LA PHYTASE

PREMIÈRE THÈSE

pour l'obtention du

DIPLÔME DE DOCTORAT D'ÉTAT EN PHARMACIE

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

soutenues le

1949

PAR

Charles PEREZ

*Titulaire des Certificats d'Etudes supérieures de Chimie biologique appliquée
et de Microbiologie, Sérologie, Hématologie et Parasitologie.*

JURY { MM. P. FLEURY, *Président.*
G. VALETTE, *Professeur.*
J. COURTOIS, *Professeur sans chaire.*

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE M. DECLUME

1949



Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. René FABRE.....	Doyen, O. *, ☉ I.
DELABY.....	Assesseur, O. *, ☉ I.
G. CUVIER.....	Secrétaire, ☉ I.
L. JEANDEL.....	Rédacteur, ☉ A.

PROFESSEURS

MM. FABRE, O. *, ☉ I.....	Toxicologie.
PICON, *, ☉ I.....	Chimie minérale.
DELABY, O. *, ☉ I....	Pharmacie chimique.
MASCRE, *, ☉ I.....	Botanique
SARTORY, (A.) C. *, ☉ I.	Microbiologie.
FLEURY, *, ☉ I.....	Chimie biologique.
JANOT, ☉ I.	Pharmacie galénique.
CHARONNAT, ☉ I.....	Chimie organique.
VALETTE, ☉ I.	Zoologie appliquée.
BEDEL, *, ☉ I.....	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
PARIS.....	Histoire naturelle des Médicaments simples d'origine végétale.
GUILLOT.....	Physique.
GAUTIER, ☉ I.....	Chimie analytique.
RAOUL.....	Professeur sans Chaire.
DOMANGE, ☉ I.....	Professeur sans Chaire.
CRÉTÉ.....	Professeur sans Chaire.
COURTOIS.....	Professeur sans Chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. *, ☉ I.

Professeurs honoraires : MM. DELÉPINE, O. *, ☉ I., et LEBEAU, C. *, ☉ I.
Membres de l'Institut.

PERROT, C. *, ☉ I., COUTIÈRE, O. *, ☉ I.
BOUGAULT, O. *, ☉ I., LUTZ, *, ☉ I.,
GORIS, O. *, ☉ I. HÉRISSEY, O. *, ☉ I.,
LAUNOY, O. *, ☉ I. SOMMELET O. *, ☉ I.

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

MM. MORETTE.....	Sciences physiques et chimiques.
LAMBIN (M ^{lle}), ☉ I. . .	Sciences naturelles.
CAVIER.....	Sciences naturelles.
TRUHAUT *, ☉ I.....	Sciences appliquées.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. CORRIEZ, ☉ I.	Physique.
HARISPE, trav. pratiques de 1 ^{re} année.	Chimie générale et pharmaceutique.
MANGEOT.....	Chimie 4 ^e année.
N.....	Biologie animale.
MOREAU.....	Chimie analytique,
DEYSSON.....	Botanique.
GERMAN.....	Microbiologie (Ch. de fonctions).
GIRARD.....	Sciences pharmaceutiques.

Bibliothécaire en chef : M. GARNIER, ☉ I.

Bibliothécaire : M^{lle} LAVAUD, ☉ A.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. FLEURY

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS
PHARMACIEN-CHEF DES HÔPITAUX PSYCHIÂTRIQUES DE LA SEINE
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

*Qui a bien voulu nous accueillir
dans son laboratoire et présider notre
Jury d'examen.*

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GUILLAUME VALETTE

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS
PHARMACIEN DES HÔPITAUX DE PARIS

*Qui a accepté de s'intéresser à nos
études et d'examiner notre travail.*

Respectueux Hommage.

A MONSIEUR JEAN COURTOIS

PROFESSEUR SANS CHAIRE A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS
PHARMACIEN DES HÔPITAUX DE PARIS

Qui a constamment dirigé nos recherches et nous a permis de les mener à bien.

Hommage de respectueux attachement.

A MON PÈRE

A MA MÈRE

envers qui ma gratitude est infinie.

A MES CHERS FRÈRE ET SŒURS

A MES CHERS BEAUX-FRÈRES

A MA FAMILLE

A MES AMIS

INTRODUCTION.

La phytase est certainement l'une des moins connues des diverses phosphatases plus ou moins spécifiques. Le plus souvent elle n'a été étudiée qu'incidemment au cours de travaux généraux sur les phosphatases, les recherches systématiques sur la phytase ne sont encore que peu nombreuses. Depuis quelques années, les travaux réalisés dans le domaine de la Chimie Alimentaire ont mis en évidence l'importance de la phytase dans l'utilisation de l'acide phosphorique provenant des inositophosphates des aliments. C'est pourquoi, sur les conseils de MM. P. FLEURY et J. COURTOIS, nous avons entrepris notre travail en vue de préciser un certain nombre de points : relation entre l'activité phytasique et la teneur en inositophosphates des végétaux, possibilité d'accroître l'activité phytasique des préparations soit en provoquant l'élaboration d'un enzyme d'adaptation, soit en étudiant l'influence de la germination sur l'activité phytasique des graines.

Nous avons enfin complété ces recherches par l'étude des propriétés de deux préparations de phytase : celle des graines de Radis et celle des graines de Seigle. Nous avons étudié plus spécialement leur purification et l'influence des effecteurs. Nous nous sommes efforcés de préciser en particulier si un substrat banal des phosphatases le glycérrophosphate et le substrat caractéristique des phytases l'inositolhexaphosphate étaient dédoublés par le même enzyme ou au contraire par deux enzymes distincts. Avant d'aborder l'exposé de nos recherches, nous tenons à exprimer notre respectueuse gratitude à M. le Professeur P. FLEURY, qui nous a accueilli, dans son laboratoire et a bien voulu s'intéresser à nos travaux. Nous sommes particulièrement sensibles à l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider notre jury d'examen.

Nous désirons également exprimer nos respectueux remerciements au Professeur G. VALETTE qui a bien voulu nous agréer comme stagiaire dans son laboratoire de Biochimie Mé-

dicale à l'Hôpital Cochin, et a accepté d'examiner notre travail.

M. COURTOIS, Professeur sans chaire, nous a guidé continuellement au cours de nos recherches, nous faisant profiter de sa grande expérience dans ce domaine de l'enzymologie. Nous tenons à lui exprimer toute notre gratitude et notre profond attachement.

Il nous est agréable de remercier M. CATTELAÏN, Docteur ès Sciences, assistant de la chaire, de nous avoir constamment prodigué ses encouragements et facilité l'exécution matérielle de notre travail.

Nous voudrions également remercier notre maître de stage M. J. LUCIANI qui nous a sans cesse marqué sa confiance.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à M. H. DIACONO, Directeur de la Section Biologique et Pharmacologique de l'Institut des Hautes-Etudes de Tunis, qui nous a si bienveillamment accueilli dans son laboratoire pour y poursuivre nos recherches.

Nous garderons le meilleur souvenir de nos camarades du Laboratoire de Chimie biologique dont l'ambiance studieuse incitait à la recherche.

PLAN DU TRAVAIL.

Généralités sur la Phytase.

PREMIÈRE PARTIE.

Activité phytasique de diverses graines et feuilles.

CHAPITRE I. — Description des techniques analytiques utilisées.

CHAPITRE II. — Teneur en inositophosphates et activité phytasique de diverses graines.

CHAPITRE III. — Teneur en inositophosphates et activité phytasique de quelques variétés de Blé.

CHAPITRE IV. — Activité phytasique de quelques feuilles.

DEUXIÈME PARTIE.

Recherches en vue d'obtenir des matières premières dont l'activité phytasique a été artificiellement accrue.

INTRODUCTION.

CHAPITRE I. — Cultures répétées de *Aspergillus* sur un milieu renfermant de l'inositophosphate.

CHAPITRE II. — Influence de la germination sur le développement de l'activité phytasique.

CHAPITRE III. — Action de la pepsine et de la papaïne sur la glycérophosphatase et la phytase des graines.

TROISIÈME PARTIE.

Etude particulière de deux phytases de graines.

INTRODUCTION.

CHAPITRE I. — Essais de purification et de fractionnement des phosphatases du Radis non germé.

CHAPITRE II. — Action de divers effecteurs sur les phosphatases du Radis non germé.

CHAPITRE III. — Recherches en vue de préciser le mode d'action inhibitrice des oxalates sur les phosphatases du Radis non germé.

CHAPITRE IV. — Essais de purification et de fractionnement des phosphatases du Radis soumis à la germination.

CHAPITRE V. — Action de divers effecteurs physiques et chimiques sur les phosphatases du Radis germé.

CHAPITRE VI. — Etude des phosphatases du Seigle. — Essais de purification et de fractionnement.

CHAPITRE VII. — Action de divers effecteurs physiques et chimiques sur les phosphatases du Seigle.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

BIBLIOGRAPHIE.

GÉNÉRALITÉS SUR LA PHYTASE.

En 1907, SUZUKI-YOSHIMURA et TAKAISHI [69] décelèrent les premiers une activité phosphatasique en utilisant comme substrat le sel calco-magnésien de l'acide inositohexaphosphorique (acide phytique).

Il est assez paradoxal, à l'heure actuelle, de constater que la première phosphatase signalée fut l'enzyme hydrolysant l'acide phytique et que cette *phytase* représente l'une des phosphatases les moins actives et les moins répandues.

Les phosphatases sont des enzymes susceptibles de libérer l'acide orthophosphorique à partir de ses combinaisons minérales ou organiques.

L'on distingue actuellement plusieurs groupes de phosphatases classées d'après la nature chimique des substrats qu'elles sont capables de transformer (1). C'est ainsi que l'on peut envisager l'existence des principaux groupes suivants :

1° les *polyphosphatases* hydrolysant les liaisons entre les radicaux phosphorés des acides polyphosphoriques. Les pyrophosphatases, qui dédoublent l'acide pyrophosphorique en deux molécules d'acide orthophosphorique, sont les représentants les mieux connus de ce groupe.

2° les *phosphamidases* libèrent l'acide orthophosphorique de ses combinaisons avec un atome d'azote substitué.

3° les *phosphodiesterases* hydrolysent les diesters de l'acide orthophosphorique en une molécule de monoester orthophosphorique et une molécule d'acide orthophosphorique.

4° les *phosphomonoestérases* hydrolysent les monoesters orthophosphoriques en une molécule d'alcool ou phénol et une molécule d'acide orthophosphorique. Il apparaît logique de placer la phytase dans ce dernier groupe. Les phosphomonoestérases sont les phosphatases les plus répandues et les mieux

(1) J. ROCHE et J. COURTOIS [64] ont publié une revue détaillée de cette question.

étudiées. Ce groupe englobe des enzymes d'une spécificité très étendue aptes à dédoubler un grand nombre d'esters d'alcools ou phénols les plus variés.

J. COURTOIS [21] propose de les désigner sous le terme de *phosphomonoestérases banales*.

Il existe d'autres monoestérases à spécificité beaucoup plus restreinte s'exerçant sur un petit groupe d'esters phosphoriques ou parfois même sur un seul ester.

C'est ainsi, que l'on connaît : une hexosediphosphatase spécifique de l'acide fructofurannose-1-6-diphosphorique (ester de HARDEN et YOUNG), des nucléotidases spécifiques de certains mononucléotides, etc...

Généralement, la phytase est considérée comme l'une de ces phosphomonoestérases relativement spécifiques. Ce problème sera envisagé ultérieurement. Dans l'état actuel de nos connaissances, il apparaît rationnel de définir la phytase comme étant : la *phosphatase qui libère de l'acide orthophosphorique à partir de l'acide inositolhexaphosphorique ou acide phytique*.

Cette définition permet d'assimiler certaines phytases à d'autres monoestérases à champ d'action étendu. Il est d'ailleurs indispensable de préciser que des substrats hydrolysables par des phosphatases spécifiques peuvent dans certains cas être hydrolysés par d'autres enzymes à champ d'action plus étendu. C'est ainsi que les phosphomonoestérases banales hydrolysent l'acide fructose-diphosphorique et les mononucléotides.

Dans un but de simplification on a subdivisé les phosphomonoestérases banales en quatre principaux groupes. Ces enzymes sont dits *isodynames*, ils hydrolysent les mêmes substrats mais diffèrent par un certain nombre de caractères : répartition — pH optimum — action des effecteurs chimiques.

Plusieurs types de phytases isodynames paraissent exister.

Avant d'envisager leur classification nous étudierons tout d'abord leur répartition.

RÉPARTITION DE LA PHYTASE.

I. — Règne Végétal.

PHANÉROGAMES.

A) *Graines*. — La phytase a été décelée dans de nombreuses graines, cependant les activités peuvent varier d'une façon étendue selon les espèces.

FLEURY et COURTOIS [26], MÖLLGAARD [51] ont déjà signalé ces variations. Dans ce travail, nous avons également constaté qu'il existait de très nettes différences entre les activités phytasiques de diverses graines et qu'il n'y avait pas de rapport entre l'origine botanique de la graine et son activité phytasique.

Peu de recherches ont été faites pour savoir si dans le cadre d'une même espèce, il existait des variations de l'activité phytasique entre les diverses variétés.

ALBAUM et UMBREIT [3] signalent sans beaucoup de détails un accroissement d'activité phytasique de l'Avoine au cours de la germination.

B) *Tubercules*. — A part l'observation de PFANKUCH [57] relatant la présence d'une phytase active dans le suc de pomme de terre, cette question n'a pas été étudiée.

C) *Feuilles*. — A notre connaissance il n'existe pas de recherches sur ce sujet c'est pourquoi nous avons abordé cette question au cours de notre travail.

D) *Fruits*. — AXELROD [4] a trouvé que le suc des Oranges renferme une phytase active à pH 5,0. Cet enzyme hydrolyse plus lentement l'inositohexaphosphate que d'autres monoesters phosphoriques.

CRYPTOGAMES.

Les recherches ont porté principalement sur les *Aspergillus*.

JEGOROW [36] cultiva l'*Aspergillus Niger* et le *Penicillium crustaceum* sur un milieu nutritif contenant de l'inositohexaphosphate comme seule source de phosphore. Il observa qu'il y avait libération d'acide orthophosphorique dans le milieu de culture (1).

(1) Dans certains cas le poids du mycélium s'avérait plus élevé qu'avec le même milieu nutritif lorsque l'inositohexaphosphate était remplacé par de l'orthophosphate. Cet accroissement de poids est sans doute dû à la libération d'inositol, qui est un facteur de croissance, au cours de l'hydrolyse phytasique.

A la même époque, DOX [23] relate que l'inositophosphate de calcium et magnésium représente une excellente source de phosphore pour le développement de l'*Aspergillus Niger*.

Avec GOLDEN [24] il étudia divers *Aspergillus* : *niger*, *fumigatus*, *clavatus*, et réussit à caractériser une phytase dans les suspensions de mycéliums broyés avec du sable. Ces auteurs montrent également qu'une phytase diffusait du mycélium dans le milieu de culture liquide.

L'*A. niger* fournit les préparations les plus actives. KOHEI MIYAGAWA [50] a décelé une activité phytasique dans les extraits aqueux de *Rhizopus orizae*, de *Rhizopus japonicus* et *Aspergillus orizae*. SUMI [68] mentionne une phytase dans les spores desséchées à l'air d'*A. orizae*. SHIMODA [65] a décelé une phytase active à pH 4,4 dans *Mycoderma A Takahashi* et une phytase active au très bas pH de 2,2 dans *Pichia Farinosa* [65].

Les travaux de PLIMMER [58] ne mentionnent pas d'activité phytasique dans les levures.

Ainsi les Cryptogames n'ont pas beaucoup été étudiées, et peu de choses ont été faites pour essayer d'améliorer l'activité phytasique des milieux après culture afin de fournir d'utiles renseignements sur cette question.

C'est pourquoi, au cours de ce travail, nous avons tenté d'accroître l'activité phytasique de l'*Aspergillus* en le cultivant sur un milieu dont la seule source de phosphore était représentée par l'acide inositohexaphosphorique.

BACTÉRIES.

En dehors de quelques observations de STARKENSTEIN [67] avec le Colibacille aucune recherche n'a été effectuée, à notre connaissance, sur les phytases bactériennes.

II. — Règne animal.

Une partie des travaux datent d'une époque où l'on n'avait pas établi définitivement l'influence capitale du pH sur les réactions enzymatiques ; ceci explique pourquoi, il subsiste encore une certaine confusion dans ce domaine.

Dans un tissu où, à un pH déterminé, on ne peut déceler d'activité phytasique, il est possible d'envisager l'existence d'une phytase active à un pH différent.

Des recherches systématiques s'étendant de pH 3,0 à 10,0

doivent être effectuées avant de pouvoir affirmer l'absence de phytase dans un tissu.

Nous nous bornerons à mentionner les principaux résultats en précisant le pH optimum observé au cours des essais.

a) *Intestin*. — Ce sont les phytases animales les plus étudiées et les mieux connues. PLIMMER [58] en 1913 puis LOWE et STEENBOCK [40] ne purent déceler d'activité phytasique dans des extraits d'intestins de divers animaux carnivores ou non.

Par contre, PATWARDHAN [56], KREIGER [39] puis SPITZER et PHILIPS [66] relatent la présence d'une phytase active en milieu alcalin (pH 7,0 à 7,8) dans l'intestin de quelques Mammifères. Sa distribution semble irrégulière, on ne paraît l'avoir décelée régulièrement que chez le Rat.

b) *Matières fécales*. — Il semble qu'elles contiennent deux phosphomonoestérases distinctes : la première de pH optimum, 9,0 d'origine intestinale BOWERS, OUTHOUSE et FORBES [7] ; la seconde de pH optimum 5,0, moins active que la précédente, et peut-être d'origine alimentaire ou bactérienne. Il est très probable que deux phytases de même origine et à caractères voisins sont présentes dans les matières fécales. Les travaux de LOWE et STEENBOCK [40], de PATWARDHAN [56] et de SPITZER et PHILIPS [66] plaident dans ce sens.

Avec J. COURTOIS dans des recherches qui n'ont pas trouvé place dans le cadre de ce travail, nous avons décelé dans des suspensions de fèces humaines une phytase assez active à pH 5,2 et une seconde d'activité moindre réagissant à pH 8,0.

c) *Rein*. — Mac COLLUM et HART [44], COURTOIS [11], COURTOIS et JOSEPH [17], HORIUCHI [34] n'ont pas décelé d'activité phytasique en milieu alcalin dans des autolysats de rein de divers animaux.

Seul STARKENSTEIN [67] a observé en milieu alcalin une hydrolyse de l'inositohexaphosphate par le rein de Cobaye. HORIUCHI [34] aurait décelé une phytase active, à pH optimum de 4,3, tandis que J. COURTOIS [11] n'a pas trouvé à pH 5,2 d'activité phytasique dans un autolysat de reins de rats rachitiques.

d) *Foie*. — STARKENSTEIN [67], MAC-COLLUM et HART [44] ont décelé une phytase active en milieu alcalin dans le foie de certains animaux.

HORIUCHI [34], J. COURTOIS [11] n'en ont pas rencontré chez d'autres animaux en opérant au même pH. Par contre, HORIUCHI [34] signale la présence d'une certaine activité phytasique à pH 4,3.

e) *Os.* — Une phosphomonoestérase très active en milieu faiblement alcalin est contenue dans les os.

PATWARDHAN [56], COURTOIS [11], COURTOIS et JOSEPH [17] ont vu qu'elle était dépourvue d'action sur l'inositohexaphosphate.

HORIUCHI [34] mentionne la présence d'une phytase peu active réagissant à pH 4,3 dans les os du Lapin.

f) *Muscles.* — En milieu alcalin STARKENSTEIN [67] aurait décelé une phytase dans les muscles de Lapin que HORIUCHI [34] n'a pu retrouver par la suite.

MAC-COLLUM et HART [44], confirment cette absence d'activité phytasique en milieu alcalin.

A pH 4,3 HORIUCHI [34] mentionne une phytase d'activité moyenne.

d) *Prostate.* — COURTOIS et JOSEPH [17] ont observé une certaine activité à pH 5,2 d'un extrait de prostate. Avec un autre échantillon PLUMEL [59] n'a pas décelé d'activité appréciable. PLUMEL a également constaté que le sperme humain est pratiquement dépourvu d'activité phytasique.

e) *Urine.* — COURTOIS et BIGET [15], COURTOIS et PLUMEL [20], PLUMEL [59] ont signalé que l'activité phytasique est toujours des plus minimes par rapport à l'activité glycérophosphatasique.

f) *Sang.* — L'origine des enzymes dans le sang est multiple car ils y sont déversés par les tissus.

Leur présence ou leur absence reflète l'élaboration de ces enzymes dans les tissus de l'organisme.

La phytase, existant dans le plasma des animaux inférieurs, se rencontre rarement et irrégulièrement dans celui des Mammifères.

TABLEAU I.

Action des plasmas de divers animaux sur le glycérophosphate et l'inositohexaphosphate d'après RAPOPORT, LEVA et GUEST [62].

Origine	Activité phytasique	Activité glycérophos- phatasique	Origine	Activité phytasique	Activité glycérophos- phatasique
Oie	1,22	1,68	Chabot	0,70	0,50
Pigeon	1,05	0,36	Perche	1,7	0,30
Canard	0,52		Homme	<0,03	1,60
Poussin	0,10	1,0	Lapin	<0,03	1,26
Tortue	0,71	0,90	Cobaye	0	1,40
Serpent-Mocassin	0,25	9,5	Bœuf	0	
Grenouille-Taureau...	0,30	0,75	Veau	0	

Les chiffres représentent le nombre de millig. de phosphore libérés sous forme d'acide orthophosphorique par 100 cm³ de plasma à pH 6,6.

TABLEAU II.

Action des enzymes du sérum sur le glycérophosphate et l'inositohexaphosphate d'après PLUMEL [59].

Origine du sérum	Homme				Porc			
β-Glycérophosphate	7,58	4,17	1,61	3,87	10,0	16,2	8,0	6,88
Inositohexaphosphate	0	2,77	0,75	0,45	0,0	0,4	2,18	0,05

Les chiffres représentent le nombre de millig. de phosphore libérés sous forme d'acide orthophosphorique dans des conditions opératoires identiques à pH 5,2.

Dans le tableau I, nous voyons que la phytase, pratiquement absente du plasma de tous les Mammifères, a été retrouvée chez tous les autres animaux étudiés. Certains plasmas présentent même une activité phytasique supérieure à leur activité glycérophosphatasique. Ce sont, jusqu'à plus ample informé les seuls exemples dans la série animale.

RAPOPORT, LEVA et GUEST [62] mentionnent que les phytases sériques ont un pH optimum compris entre 6,0 et 7,0 et que la distribution de leur activité est complètement indépendante de l'activité glycérophosphatasique ou nucléophosphatasique.

Il faut enfin noter sur cette question la contribution de MAC-

COLLUM et HART [44] de MARTLAND, HANSMAN et ROBINSON [45].

COURTOIS et JOSEPH [17], M. PLUMEL [59] ont surtout montré l'irrégularité de l'activité phytasique dans des sérums de la même espèce (Homme — Porc).

Dans le tableau II, nous avons relevé les résultats de PLUMEL [59]. Les variations de l'activité phytasique sont plus étendues que celles de l'activité monoestérasique. RAPOPORT, LEVA et GUEST [61] ont par ailleurs trouvé que les hématies de certains animaux : Oie — Pigeon — Poulet — renfermaient une phytase active à pH 6,8, tandis que les érythrocytes d'autres animaux (Grenouille — Serpents — Mammifères) en seraient dépourvus.

CONCLUSIONS SUR LA DISTRIBUTION DE LA PHYTASE DANS LE RÈGNE ANIMAL.

La phytase apparaît comme beaucoup moins répandue que les phosphomonoestérases dans le règne animal.

A l'exception des phytases de l'intestin du Rat et du sérum de vertébrés inférieurs, il semble que la rareté et l'irrégularité de la répartition de la phytase animale soit la règle générale.

CLASSIFICATION DES PHYTASES.

Dans une revue en cours de publication, J. COURTOIS [21] propose de classer les phytases en quatre types.

1. Le type I analogue aux phosphomonoestérases I. La phytase I la mieux connue, est celle de l'intestin du Rat ; elle agit au pH optimum de 7,8. PATWARDHAN [56], SPITZER et PHILIPPS [66].

PATWARDHAN [56] et KREIGER [39] ont montré que la phytase intestinale purifiée est activée par les ions magnésium comme la phosphomonoestérase I.

2. Le type II a des analogies très marquées avec les phosphomonoestérases II. Son pH optimum est de 5,0 à 5,6.

C'est dans ce groupe que se rangent les phytases des graines et des plantes ainsi que celles d'action irrégulière décelées dans la prostate, ou le sérum des mammifères.

Le Fluorure de Sodium inhibe fortement ces enzymes qui ne

sont pas activés par les sels de magnésium. Les phytases de ce groupe ont été étudiées par ADLER [2], FLEURY et COURTOIS [26, 27], COURTOIS [11, 12, 13, 14]. Leur étude fait l'objet de la majeure partie de notre thèse.

3. Le type III serait représenté par la phytase d'*Aspergillus* dont le pH optimum est voisin de 4,8, FLEURY et COURTOIS [26]. Les phytases animales actives à pH 4,3 trouvées par HORIUCHI [34] semblent pouvoir s'intégrer dans ce groupe.

4. Le type IV a de nombreuses analogies avec le type IV de phosphomonoestérases décelé dans les hématies par ROCHE. C'est celui groupant les phytases des hématies et du plasma des vertébrés inférieurs. RAPOPORT, LEVA et GUEST [61].

Le pH optimum serait voisin de 6,0 et les limites d'action iraient de pH 4,0 à 9,0.

Les ions Magnésium n'activent pas la phytase IV et les fluorures et les oxalates l'inhibent.

CARACTÈRES DES PHYTASES.

I. — Cinétique.

Il est hors de doute que la phytase peut hydrolyser totalement l'inositohexaphosphate en une molécule d'inositol et six molécules d'acide orthophosphorique.

La fixation du substrat sur l'enzyme s'effectue aisément et l'association phytase/inositophosphate est bien stable car l'affinité (1) de la phytase pour l'inositohexaphosphate est relativement élevée.

Ce fait a été confirmé par FLEURY et COURTOIS [27], par LÜERS et SILBEREISEN [41], par RAPOPORT, LEVA et GUEST [61].

Les phosphates libérés par hydrolyse inhibent en général l'enzyme LÜERS et SILBEREISEN [41].

II. — Action de la chaleur.

Comme tous les enzymes, la phytase est plus thermolabile en solution que sous forme solide et desséchée, MAC-CANCE et WIDDOWSON [43].

(1) L'affinité est l'inverse de la constante de dissociation moléculaire de la combinaison enzyme-substrat (constante de MICHAELIS).

TABLEAU III.

Inactivations thermiques de la phytase et de la glycérophosphatase associées d'après FLEURY et COURTOIS [27] : Son de Blé : COURTOIS [13] : Moutarde Blanche : RAPOPORT, LEVA et GUEST [61] : plasma d'Oie.

Type et origine de l'enzyme		II. Son de Blé			II. Moutarde Blanche			IV. Plasma d'Oie		
Température de l'essai		74°	75°	80°	85°	87°	90°	60°	70°	80°
Pourcentage d'inactivation	Phytase.....	95	98	100	89	98	100	87	96	100
	Glycérophosphatase.....	77	80	97	46	95	98			
Substrats Inositolhexaphosphate et β Glycérophosphate. Durée de chauffage : 5 minutes à pH 5,2 pour les enzymes II, 10 minutes à pH 6,4 pour l'enzyme IV.										

A la lecture du Tableau III il apparaît que la phytase n'est pas un enzyme particulièrement thermostable, une légère activité phosphatasique persiste même quand la phytase est totalement inactivée.

Au cours de notre travail nous avons d'ailleurs étudié l'inactivation thermique de phytases d'autres origines. Chaque fois nous avons observé que la phytase est un peu plus thermolabile que la phosphatase associée.

SPÉCIFICITÉ DES PHYTASES.

Un fait important semble se dégager de tous les travaux portant sur l'activité phytasique : il existe de nombreuses préparations phosphatasiques hydrolysant des monoesters comme les glycérophosphates mais pratiquement dépourvues d'action sur l'inositolhexaphosphate.

Par contre, toutes les préparations susceptibles d'hydrolyser l'inositolhexaphosphate ont également hydrolysé le glycérophosphate.

Dans une revue générale en cours d'impression, COURTOIS discute plusieurs hypothèses susceptibles d'interpréter ce comportement.

1. Les glycérophosphates ou les autres monoesters sont hydrolysés par des enzymes totalement inactifs sur l'inositolhexaphosphates.

Certaines phytases animales du type I seraient peut-être des monoestérases hydrolysant lentement et difficilement l'inositohexaphosphate par suite de l'encombrement stérique provoqué par les six radicaux phosphorés.

2. La phytase serait une phosphomonoestérase banale nécessitant un activateur thermolabile pour hydrolyser l'acide phytique.

3. La phytase serait un enzyme spécifique de l'inositohexaphosphate et sans action sur d'autres esters phosphoriques.

La discussion de ces trois premières interprétations par J. COURTOIS [21] ne permet pas de les retenir pour le moment. C'est pourquoi, avec P. FLEURY [27] il a envisagé une quatrième possibilité qui paraît mieux cadrer avec les faits :

4. La phytase serait une *Superphosphatase* à champ d'action étendu, que P. FLEURY et J. COURTOIS proposent de dénommer *phytophosphatase*.

Cette dernière hydrolyserait les esters phosphoriques de l'inositol ainsi que d'autres monoesters dédoublés par les phosphomonoestérases banales.

Cette hypothèse est étayée par de nombreuses observations.

P. FLEURY et J. COURTOIS [27] comparant les cinétiques d'hydrolyse des glycérophosphates et de l'inositohexaphosphate par les enzymes du Son de Blé ont observé que tout se passe comme si la préparation enzymatique contenait un mélange de phytophosphatase et de phosphomonoestérase banale. Les essais effectués sur des préparations très actives obtenues par fractionnement au sulfate d'Ammonium et adsorptions diverses ont contribué à confirmer cette hypothèse.

5. Il convient de mentionner ici l'interprétation proposée par COVELLO [22] basée sur l'hypothèse de la structure pyrophosphorique de l'acide phytique envisagée autrefois par STARKENSTEIN [67].

Il apparaît des plus douteux que l'acide phytique possède des liaisons pyrophosphoriques.

D'autre part, COURTOIS (recherches non publiées) vient récemment de confirmer l'existence de nombreuses préparations actives sur le pyrophosphate mais inactives sur l'inositohexaphosphate.

Il semble donc que si la phytase est peut-être une pyrophosphatase d'un caractère spécial, la presque totalité des pyrophosphatases sont dépourvues d'action phytasique.

CHAMP D'ACTION DE LA PHYTASE.

COURTOIS [14] a montré qu'il existe des phytophosphatases et monoestérases associées pouvant transformer un certain nombre de substrats communs. COURTOIS et JOSEPH [17] et COURTOIS (recherches inédites), ont également observé qu'il existait des substrats hydrolysés par l'un de ces deux enzymes et non par l'autre.

MÉCANISME D'ACTION DE LA PHYTASE.

S. et T. POSTERNAK [60], ont trouvé que le clivage des six liaisons ester de l'inositohexaphosphate par la phytase, s'effectuait successivement. COURTOIS et JOSEPH [18] ont établi que la phytase attaque, en réalité les liaisons ester disposées en méta par rapport à la première fonction alcoolique libérée.

CONCLUSIONS.

De nombreux auteurs ont étudié l'action des préparations enzymatiques sur l'inositohexaphosphate ; cette étude a rarement porté sur les seules phytases, mais surtout sur les autres phosphatases associées, ce qui explique en grande partie l'imprécision et le manque de cohésion rencontrés, au cours des faits que nous venons de rapporter.

L'intérêt grandissant du rôle de la phytase en hygiène alimentaire ne nous a pas échappé, c'est pourquoi nous nous sommes efforcés de compléter et préciser nos connaissances sur la phytase au cours de notre travail.

PREMIÈRE PARTIE.

Activité Phytasique de diverses graines et feuilles.

CHAPITRE I.

Description des techniques analytiques utilisées.

A) Détermination des activités β glycérophosphatasique et phytasique.

Pour l'étude de ces activités nous utiliserons des substrats tamponnés à pH 5,2 et possédant la composition suivante :

Solution de β glycérophosphate de sodium M/10

β glycérophosphate de sodium cristallisé à 5 OH ₂	12 g. 20
Acide Acétique 2 N	18 cm ³
Tampon acide acétique acétate de sodium M/2 de pH 5,2	100 cm ³
Eau distillée q.s.p.	400 cm ³

Solution d'Inositohexaphosphate M/10 en acide phosphorique esterifié

Inositohexaphosphate de sodium	12 g.
(à 35 OH ₂)	
Acide acétique 2 N	26 cm ³
Tampon acide acétique acétate de sodium M/2 de pH 5,2	100 cm ³
Eau distillés q.s.p.	400 cm ³

Le pH des tampons et des substrats amenés ainsi à 5,2 est vérifié par la méthode de CLARK, et LUBS en présence de rouge de méthyle ou par le potentiopHmètre,

PROTOCOLE DES ESSAIS POUR L'ÉTUDE DES GRAINES.

Nous pulvérisons très finement les graines à l'aide d'un moulin puis du mortier. La poudre obtenue est mise à macérer dans de l'eau distillée toluénée à raison de 5 grammes de poudre pour 100 cm³ d'eau. Nous laissons la diffusion des enzymes s'opérer durant une heure à la température de la glacière, puis nous réalisons une agitation mécanique d'une demi-heure à la température du laboratoire. Nous filtrons alors, sur papier en plaçant le récipient et l'entonnoir dans une glacière ou, ce qui est plus rapidement réalisé, nous centrifugeons pendant 30 minutes, à une vitesse de 3.000 tours minute. Nous utilisons la préparation liquide limpide ainsi obtenue et nous la faisons réagir pendant une durée déterminée à la température de 37°, avec 5 cm³ de substrat M/10 en acide phosphorique estérifié, en présence de 10 cm³ de tampon acétate de sodium-acide acétique M/2 de pH 5,2 et de l'eau distillée toluénée en quantité suffisante pour 50 cm³ ;

A la fin de la réaction, l'acide phosphorique libéré est dosé de la manière suivante :

a) *défécation des protéines.*

Nous ajoutons au milieu réactionnel 10 cm³ d'un mélange à parties égales d'acide acétique cristallisable et d'acétate d'ammonium officinal puis nous additionnons de 20 cm³ de mixture magnésienne (Nitrate de Magnésium 50 g., Nitrate d'Ammonium 100 g. Eau distillée q.s. 1 litre) ; le flacon est placé durant 30 minutes sur un bain-marie bouillant. Nous filtrons ensuite pour éliminer les protéines floculées.

b) *Précipitation du phosphate ammoniaco-magnésien.*

Le filtrat additionné des eaux de lavage est alcalinisé fortement avec de l'ammoniaque pure à 20 p. 100 (Codex) en présence de phénol-phtaléine jusqu'à teinte rouge vineuse.

Nous laissons en contact 24 heures au moins pour permettre au phosphate ammoniaco-magnésien de précipiter intégralement.

c) *Dosage par la méthode de Copaux du phosphate précipité.*

Nous recueillons ensuite sur un petit filtre sans plis le précipité formé, et le dissolvons dans un mélange de 5 cm³ d'acide nitrique ($d = 1,39$) et 10 cm³ d'eau distillée. Nous lavons le flacon et le filtre avec 10 cm³ d'eau distillée puis nous essorons le filtre, en le comprimant fortement.

L'acide phosphorique est dosé par la méthode de Copaux couramment utilisée dans ce laboratoire. COURTOIS [9, 10], BOSSARD [16, 6].

Nous transvasons les liquides dans une ampoule de Copaux et nous ajoutons 8 cm³ d'éther sulfurique. Nous agitons énergiquement et assez longuement puis nous ajoutons 10 cm³ de solution de molybdate de sodium obtenue : soit par dissolution du sel commercial à la dose de 120 g. p. 1000; soit en neutralisant à chaud 100 g. d'acide molybdique suspendus dans un litre d'eau distillée, par 60 g. de carbonate de sodium.

Après nouvelle agitation, nous centrifugeons et nous obtenons un complexe : l'acide phosphoduodecimolybdique qui associé à de l'eau et à de l'éther, s'est précipité sous forme d'un liquide jaune huileux plus dense que l'eau, et dont nous mesurons le volume dans la tubulure inférieure (1).

L'activité ainsi mesurée, après hydrolyse et défécation, sera exprimée par le nombre de milligrammes de phosphore libérés sous forme d'acide orthophosphorique, dans les conditions de l'essai.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE POUR L'ÉTUDE DES PLANTES FRAÎCHES.

Nous avons d'abord mesuré l'activité des feuilles fraîches puis celle de ces mêmes feuilles après dessiccation à 37°.

Les feuilles fraîches sont sectionnées aux ciseaux, à la base du limbe afin de conserver le moins possible de pétioles, de grosses nervures ou de tigelles.

Les parties chlorophylliennes et non desséchées ou jaunies sont alors coupées finement avec des ciseaux, puis écrasées dans un mortier, donnant de la sorte une pâte molle assez homogène imbibée du suc de la plante.

Nous faisons une suspension au tiers de cette préparation, dans de l'eau distillée toluénée et nous agitons durant une heure à l'aide de la machine à agiter. La suspension d'enzymes ainsi obtenue est alors utilisée dans les mêmes conditions opératoires que la suspension d'enzymes de graines. Seules les prises d'essai de macération d'enzymes et les durées d'hydrolyse varient.

Pour les feuilles desséchées nous utilisons les mêmes procédés, après avoir bien desséché à l'étuve à 37° les feuilles entières.

(1) Ces tubes sont préalablement étalonnés avec des solutions titrées de phosphate monopotassique.

Nous les coupons ensuite et les écrasons finement. Nous les mettons en suspension dans de l'eau distillée toluénée, formant ainsi une macération à 5 p. 100 qui est agitée à la machine durant une heure.

Les mesures d'activité de la suspension d'enzymes des plantes desséchées sont effectuées sur les mêmes prises d'essai et dans les mêmes conditions opératoires que pour les plantes fraîches.

B) Dosage des inositohexaphosphates dans les plantes.

Nous avons utilisé une adaptation de la technique de Michel DURAND [48, 49] qui nous a fourni des résultats satisfaisants, l'acide inositolhexaphosphorique extrait par une solution d'acide trichloracétique est précipité en même temps que les orthophosphates par la mixture magnésienne en milieu ammoniacal. La teneur en phosphore organique de ce précipité correspond sensiblement à sa teneur en inositohexaphosphates.

Nous déterminons donc le phosphore minéral et le phosphore total du précipité. La différence représente le phosphore qui peut être attribué aux inositohexaphosphates. Il est possible de distinguer trois phases dans la technique opératoire.

a) *Inactivation de la phytase de la graine.*

Nous nous sommes préoccupés de l'action possible des phytases associées au phosphore phytinique dans les tissus végétaux. Au cours de la pulvérisation des graines, cette phytase peut dédoubler plus ou moins complètement l'inositohexaphosphate. C'est pourquoi nous avons en premier lieu inactivé la phytase par la chaleur ; nous avons utilisé un protocole analogue à celui établi par BOURQUELOT et HÉRISSEY pour les plantes à hétérosides.

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux nous portons à ébullition 20 cm³ d'alcool à 95° ; puis, sans interrompre l'ébullition, nous y projetons par petites fractions 10 g. de graines ; nous maintenons l'ébullition pendant 10 minutes. Après cette inactivation thermique des enzymes, les graines sont séparées par décantation, pulvérisées grossièrement et remises à digérer dix minutes dans le même alcool porté à l'ébullition. Après refroidissement nous ajoutons 30 cm³ d'éther sulfurique pour dissoudre les lipides et laissons macérer 24 heures à la température du laboratoire en agitant

fréquemment. La pâte provenant des graines est recueillie sur Büchner, essorée, desséchée à l'étuve à 37° et pulvérisée finement.

b) *Extraction du Phosphore acido-soluble.*

Nous triturons au mortier 5 g. de cette poudre avec 50 cm³ de solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100. Après centrifugation il est procédé à une seconde extraction dans les mêmes conditions.

Dans deux fioles d'Erlenmeyer nous mesurons 20 cm³ du mélange limpide des liquides extractifs, et ajoutons 20 cm³ d'une solution à 10 p. 100 de chacun des chlorures de magnésium et ammonium puis nous alcalinisons franchement par de l'ammoniaque en présence de phénolphtaléine.

Les précipités sont collectés au bout de 24 heures. Dans celui du premier flacon, nous dosons l'acide phosphorique minéral par la technique de Copaux, soit n mg. de phosphore trouvés.

Le précipité du second flacon est minéralisé en le traitant dans une fiole de Kjeldahl par les acides sulfurique et nitrique (1). Nous y dosons également l'acide phosphorique par la technique de Copaux après séparation préalable sous forme de sel ammoniaco-magnésien, soit n' mg de phosphore trouvés.

La différence phosphore organique — phosphore minéral correspond au phosphore des inositohexaphosphates (2) dont la teneur dans 100 g. de graines est égale à (n' — n) 100.

(1) Le précipité obtenu est recueilli sur un filtre sans plis, chassé avec un jet de pissette dans un ballon de Kjeldahl de 250 cm³ et additionné de 5 cm³ d'acide sulfurique concentré. Nous chauffons assez fortement pour éliminer la presque totalité de l'eau ajoutée. Nous plaçons à ce moment un entonnoir sur le col du ballon et maintenons une ébullition légère jusqu'à éclaircissement du liquide. Nous laissons refroidir puis ajoutons 5 cm³ d'acide nitrique et portons encore à ébullition modérée durant 1 heure. Le liquide dilué est additionné de mixture magnésienne et d'ammoniaque.

(2) Le phosphore lipidique a été extrait par l'éther ; le phosphore nucléoprotéidique a été insolubilisé par l'acide trichloracétique les esters acido-solubles non phytiniques n'ont pas été précipités par la mixture ammoniaco magnésienne. Dans quelques-unes des graines, nous avons également dosé les inositophosphates par la technique de Y. COLIN [8] : précipitation par le chlorure ferrique, dosage du phosphore organique du précipité. Les résultats obtenus se sont révélés sensiblement identiques à ceux déterminés à l'aide de notre technique. Par ailleurs, notre technique nous a donné pour certaines graines des chiffres analogues à ceux de MAC-CANCE et WIDDOWSON [42] ou de MELLANBY [46] qui utilisaient un protocole opératoire différent : précipitation par le chlorure ferrique. ABRAMSON [1] utilisant lui aussi le chlorure ferrique a trouvé des teneurs analogues à celles obtenues à l'aide de notre technique.

CHAPITRE II.

Teneur en inositophosphates et activité phytasique de diverses graines.

En utilisant les techniques précédemment décrites, nous avons recherché s'il existait un rapport entre la teneur en inositohexaphosphates et l'activité phytasique ou glycérphosphatasique des diverses graines.

Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau IV (1). Un premier fait se dégage indiscutablement à l'examen de ce tableau ; il n'existe aucun rapport entre la teneur en inositohexaphosphates d'une part, et l'activité glycérphosphatasique ou l'activité phytasique d'autre part.

Activité phytasique et teneur en inositohexaphosphates.

Nous observons de nettes différences entre ces deux valeurs, ceci aussi bien entre les graines d'origines différentes que pour les graines de la même famille botanique. Nous signalerons quelques exemples plus spécialement démonstratifs. Les teneurs en inositophosphates de l'Orge et de l'Avoine sont assez voisines, par contre l'Orge renferme l'une des phytases les plus actives tandis que l'activité phytasique de l'avoine est très faible comme l'avaient déjà signalé MAC CANCE et WIDDOWSON [43] puis MELLANBY [46].

Le Blé et le Seigle moins riches en inositohexaphosphates que l'Orge et l'Avoine renferment cependant les phytases de beaucoup les plus actives de toutes les graines étudiées. MAC-CANCE et WIDDOWSON [43] et HÖFF-JORGENSEN et PORSDAL [33] ont obtenu des résultats analogues pour les activités phytasiques respectives du Blé et du Seigle.

(1) Une partie des graines étudiées, entre autres les divers échantillons de Blé, nous ont été obligeamment procurés par le Service Botanique et Agronomique d'Ariana (Tunisie). Nous tenons à exprimer toute notre gratitude à M. VALDEYRON Directeur de l'Institut d'Ariana et M. SORIA FERRUCCIO Ingénieur Agronome.

TABLEAU IV.

Teneur en Phosphore Minéral et inosito-hexaphosphorique
Activités glycérophosphatasique et phytasique de diverses graines.

Origine de la Graine	Mg. de P. minéral p. 100 g. de poudre (1)	Mg. de P. inosito- hexaphosphorique p. 100 g. de poudre (1)	Activité glycéro- phosphatasique (2)		Activité phytasique (2)	
			4 j.	10 j.	4 j.	10 j.
<i>Phoenix dactylifera</i> ..	8,6	23,2	0,61	0,69	0	0,04
<i>Secale Cereale</i>	43,6	228,9	2,3 (2)	3,6 (2)	3,6 (2)	8,2 (2)
<i>Triticum sativum</i> (3) (variétés dures)	5,2	190,0	2,44 (2)	3,65 (2)	1,76 (2)	2,84 (2)
<i>Triticum sativum</i> (3) (variétés tendres) ..	2,8	160,0	2,75 (2)	2,96	1,17 (2)	1,74
<i>Avena Sativa</i>	76,0	272,0		3,0	0,43	0,43
<i>Hordeum Vulgare</i>	65,5	338,0	1,75	4,5	1,5	2,26
<i>Bromus pratensis</i>	87,0	218,0	0,65		traces	
<i>Dactylis glomerata</i> ...	65,5	436,0		11,2	0,11	1,6
<i>Zea Mays</i>	22,0	294,0	4,8	7,6	0,21	0,43
<i>Ricinus Communis</i> ...	72,0	508,6	12,4	12,5	0,34	0,91
<i>Papaver Somniferum al- bum</i>	120,0	316,0		6,3	0,8	1,4
<i>Raphanus Sativus</i>	38,1	71,0	3,4	6,8	1,2	2
<i>Sinapis Alba</i>	65,4	392,4	13,4		5,1	
<i>Citrus Nobilis</i>	29,0	116,2	5,5	14,0	0,43	1,3
<i>Citrus Vulgaris</i>	29,0	120,0	1,7	4,7	traces	0,22
<i>Citrus aurantium</i>	29,0	294,5	4,8	14,0	traces	1,22
<i>Pistacia atlantica</i>	60,0	176,0	2,5	3,2	traces	0,10
<i>Faba vulgaris</i>	47,0	527,5	6,1	8,7	traces	0,43
<i>Phaseolus lunatus</i>	43,6	196,2		8,0	0,64	0,64
<i>Lens esculenta</i>	43,8	368,5	5,45	7,8	0,43	0,94
<i>Cicer arietinum</i>	16,3	354,0	4,5	8,5	0,17	1,31

(1) Poudre stabilisée, délipidée et desséchée.

(2) Substrat β glycérophosphate (glycérophosphatase) ou inosito-hexaphosphate (phytase) mg. de P libérés sous forme de PO_4H_3 du substrat à 37° après un jour et 2 jours pour les Blés et le Seigle exclusivement et après 4 jours et 10 jours pour toutes les autres graines (15,5 mg. de P organique dans les substrats).

(3) Moyenne de cinq échantillons distincts de Blés durs ou de quatre échantillons distincts de Blés tendres.

La phytase de Seigle est deux fois plus active que celle du Blé alors que les phosphomonoestérases ont des activités sensiblement égales.

Les graines des *Citrus nobilis* et *vulgaris* ont des teneurs en inosito-phosphates sensiblement égales ; les activités phytasiques sont par contre très différentes. Il en est de même avec les graines de Moutarde, Lentille et Pois-Chiche.

Activité phytasique et glycérophosphatasique.

Il ne paraît exister aucune relation constante entre les activités des macérations de graines vis-à-vis du glycérophosphate d'une part et vis-à-vis de l'inositohexaphosphate d'autre part. C'est ainsi que la Moutarde blanche est très active sur les deux substrats tandis que les graines de Dattier et Pistachier ne possèdent qu'une action très minime sur ces substrats. Par contre l'Orge, le Radis, le Seigle, qui sont, en dehors du Blé, parmi les graines les plus riches en phytase ne présentent qu'une activité glycérophosphatasique moyenne. Inversement les fèves et les graines d'Oranger et de Ricin à glycérophosphatases très actives ne provoquent qu'une hydrolyse minime de l'inositohexaphosphate.

Nous avons indiqué p. 22 que COURTOIS et JOSEPH [17] ont observé que les phosphomonoestérases des graines inactives sur les esters penta et hexaphosphoriques de l'inositol, sont par contre susceptibles d'hydrolyser les esters de l'inositol moins riches en phosphore. Il est assez vraisemblable qu'il en est de même pour les graines étudiées ; de ce fait l'acide phosphorique, libéré par action des macérations de graines sur l'inositohexaphosphate, proviendrait pour une certaine part de l'action de la monoestérase (glycérophosphatase) sur les produits intermédiaires d'hydrolyse de l'hexaphosphate. Il en résulterait que les écarts entre les activités phytasique et glycérophosphatasique seraient en réalité plus accentués que ceux observés en ne dosant que l'acide phosphorique libéré. En effet l'Orge, dont l'activité glycérophosphatasique est minime, ne libère que très peu de phosphore de l'inositohexaphosphate entre le 4^e et le 10^e jour. Cette quantité de phosphore augmente par contre d'une façon notable avec le Dactyle où la glycérophosphatase est très active.

Activité phytasique des diverses graines.

Les graines les plus riches en phytase sont presque uniquement celles qui avaient déjà été employées par P. FLEURY et J. COURTOIS [26] : Blé, Moutarde-blanche, Pavot. A la suite de ces nouveaux essais portant sur un beaucoup plus grand nombre de graines, il n'est possible d'ajouter à la liste précédente que les graines de Seigle, Radis, Orge et Dactyle. Dans le cas

de la glycérphosphatase les graines huileuses (Moutarde, Ricin) sont plus actives que les graines amylacées (Orge, Avoine). J. COURTOIS [12] avait fait précédemment la même observation avec d'autres graines. Par contre dans les graines à phytase active nous trouvons aussi bien des graines huileuses de Crucifères que des graines amylacées de Graminées.

Il ne semble pas exister de relation entre l'activité phytasique et l'origine botanique de la graine ; trois Graminées : Brome, Maïs, Avoine étant très pauvres en phytase.

Teneur en phosphore minéral et inositophosphorique des diverses graines.

Nous avons pu noter d'assez grands écarts entre les teneurs en inositophosphates et orthophosphates des diverses graines. Il ne paraît exister aucune relation ni entre ces teneurs et l'origine botanique de la graine, ni entre les taux des deux composés phosphorés. Parmi les 20 graines étudiées celle de Fève est la plus riche (527 mg. de phosphore inosito-hexaphosphorique pour 100 g. de poudre desséchée) tandis que celle du Dattier est la plus pauvre (23 mg. de phosphore inosito-hexaphosphorique).

Ce dernier fait ne saurait surprendre par suite de la sclérisation du noyau des Dattes.

Conclusions. — Dans toutes les graines étudiées nous n'avons pas noté de relations entre la teneur en inositophosphates et les activités glycérphosphatasique et phytasique.

Par ailleurs, les activités glycérphosphatasique et phytasique des graines varient indépendamment.

① 2008年12月15日。

Teneur en inositolphosphates et activité phytasique de quelques variétés de Blé.

Les recherches précédentes ont été complétées par des déterminations dans le cadre d'une même espèce : le Blé.

Le graphique représente les résultats obtenus avec 9 variétés de blé tunisien.

Le tableau V groupe les chiffres obtenus dans l'étude de ces variétés.

TABLEAU V.

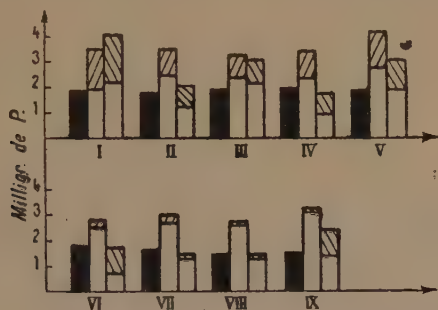
Teneur en Phosphore minéral et inosito-hexaphosphorique. Activité glycérophosphatase et phytase de diverses variétés de Blé.

Variété	Mg. de P minéral p. 100 g. de poudre	Mg. de P inositohe- phosphorique p. 100 g. de poudre	Activité glycérophos- phatásique		Activité phytásique	
			1 jour	2 jours	1 jour	2 jours
Dure Kasserine	5,2	195,0	1,96	3,53	2,22	4,14
Dure Chili	5,2	183,0	2,51	3,53	1,35	1,96
Dure Mahmoudi + Ko- kini	1,7	186	2,44	3,34	2,18	3,13
Dure Mahmoudi	1,7	200	2,40	3,49	1,09	1,83
Dure Sindjouk + Mah- moudi	1,7	189,6	2,87	4,36	1,96	3,13
Tendre Guelma	1,7	177,3	2,51	2,83	0,65	1,74
Tendre Baroota	1,7	167,7	2,70	3,05	1,35	1,39
Tendre Ariana	1,7	145,3	2,66	2,70	1,31	1,35
Tendre Mahon	1,7	151,0	3,13	3,26	1,40	2,48

Résultats exprimés en mg. de P hydrolysé en 24 h. et 48 h. à 37°.

Il n'existe pas de différences sensibles entre les teneurs en inositolphosphates des cinq échantillons de blés durs (183 à 200 mg. de phosphore inositolphosphorique p. 100).

Les écarts sont plus marqués entre les quatre échantillons de blés tendres, moins riches en inositolphosphates que les blés durs (145 à 177 mg. de phosphore inositolphosphorique).



Teneur en inositolhexaphosphates et activité glycérphosphatasique ou phytasique de diverses variétés de Blé.

Les rectangles noirs représentent le nombre de mg. de P contenus sous forme d'inositolhexaphosphates dans 1 g. de poudre de graines stabilisée délipidée et desséchée.

Les rectangles centraux correspondent au nombre de mg. de P libérés sous forme d'acide orthophosphorique à partir du glycérphosphate dans les conditions opératoires de la page 29. Partie inférieure non hachurée : quantité libérée durant les premières 24 heures. Partie supérieure hachurée : quantité libérée entre 24 heures et 48 heures.

Les rectangles les plus à droite correspondent à l'activité phytasique déterminée d'une façon similaire avec l'inositolhexaphosphate et représentée d'une façon semblable.

I. Variété de Kasserine.	VI. Variété Guelma.
II. de Chili.	VII. Baroota.
III. Mahmoudi + Kokini.	VIII. Ariana.
IV. Mahmoudi.	IX. Mahon.
V. Sindjouk + Mahmoudi.	Variétés VI à IX blés tendres.
Variétés I à V blés durs.	

Alors que les Blés durs ont des teneurs en inositolphosphates sensiblement égales, les activités phytasiques sont nettement différentes ; en particulier entre les « variétés » « Kasserine » et « Chili ». Les Blés tendres sont toujours moins riches en phytase que les Blés durs mais les écarts sont moins marqués entre les diverses variétés de Blés tendres.

Le fait le plus caractéristique est sans conteste le faible écart entre les activités glycérphosphatasique et phytasique.

Le Blé dur « Kasserine » hydrolyse l'inositolhexaphosphate plus rapidement que le glycérphosphate ; la variété « Kokini » dédouble les deux substrats à des vitesses voisines ; enfin, pour

les autres variétés l'activité glycérophosphatasique n'est que faiblement supérieure à l'activité phytasique.

Cette richesse en phytase différencie nettement le Blé, ainsi que le Seigle, de toutes les autres graines étudiées dans le tableau IV.

Il est à signaler que chez les Blés tendres l'hydrolyse ne progresse que faiblement entre le premier et le second jour alors qu'elle s'accroît plus nettement pour les Blés durs. Les enzymes des blés tendres sont peut-être plus sensibles à l'action inhibitrice des phosphates libérés au cours de l'hydrolyse.

DISCUSSION DES RÉSULTATS.

Si l'on considère que l'assimilation du phosphore des aliments dépend en partie de leur richesse en phytase, il est certain que le Blé et le Seigle occupent une place privilégiée à cet égard. Il est possible de représenter la possibilité d'utilisation du phosphore par le rapport :

mg. de P. libérés sous forme de PO_4H_3 par la phytase
mg. de P. inositohexaphosphorique dans un g. de graine.

Pour une réaction diastasique de 24 heures ce rapport a la valeur moyenne de 0,92 pour les Blés durs et de 0,73 pour les Blés tendres. De ce fait les Blés durs étudiés présentent une supériorité, sur les Blés tendres étudiés.

Si nous calculons ce rapport pour les graines alimentaires du tableau IV, nous n'observons pas de grandes différences entre l'ensemble des graines de Graminées étudiées et celles des Légumineuses, sauf pour le Seigle où ce rapport atteint 1,57.

Conclusions. — Les graines de Blé sont avec celles de Seigle de beaucoup les plus riches en phytase, les Blés durs étant plus actifs que les Blés tendres.

Les Blés durs sont plus riches en inositohexaphosphates que les Blés tendres. Il n'y a pas de relation entre la teneur en inositohexaphosphates d'une part et les activités glycérophosphatasique et phytasique d'autres part.

Les activités glycérophosphatasique et phytasique des deux variétés de Blés varient indépendamment.

CHAPITRE IV.

Activité phytasique de quelques feuilles.

Dans ce chapitre nous avons surtout insisté sur les activités monoestérasiqne et phytasique des feuilles desséchées ou non. Les inositophosphates n'ont pas été dosés, car leur taux varie au cours de la végétation (MICHEL-DURAND [49]), et ils ne peuvent de ce fait nous servir de terme de comparaison. Un certain nombre de feuilles d'arbres ou d'arbustes ont été étudiées par MICHEL-DURAND [49] et ECHEVIN [25]. Le Laurier Cerise et surtout le Gui se distinguent nettement des autres espèces étudiées par leur taux élevé en inositohexaphosphates.

La connaissance des activités phosphatasique et inositophosphatasique des graines, nous a amené à rechercher dans les plantes fraîches, et en particulier leurs parties chlorophylliennes, l'existence éventuelle d'une activité enzymatique aussi intéressante, nous espérons les utiliser comme source accessoire de phosphatase ou de phytase.

L'étude a porté sur des végétaux utilisés couramment dans l'alimentation ainsi que sur des plantes non comestibles.

Nous avons tout d'abord mesuré l'activité de la plante fraîche, puis nous avons mesuré l'activité phosphatasique de ces mêmes feuilles après dessiccation à 37°.

Cette dessiccation ne détériore pas, en principe, les enzymes et nous fournirait après pulvérisation une préparation très maniable et très constante, que l'on pourrait conserver à l'abri de l'humidité pendant une certaine durée. Un autre avantage s'ajouterait à l'emploi de poudre desséchée : la constante rigueur des essais pratiqués avec elle.

Protocole opératoire.

Nous l'avons indiqué au chapitre I, p. 25. Les mesures des activités ont été effectuées selon les procédés habituels en prenant 10 cm³ de suspension que nous avons mis en présence de 5 cm³ de substrat M/10 en acide phosphorique estérifié en milieu tamponné à pH 5,2.

Les durées d'hydrolyse ont varié selon le cas et nous les avons indiqué sur le tableau VI.

Les feuilles desséchées et pulvérisées (chapitre I, p. 25) sont mises en suspension dans de l'eau distillée toluénée donnant ainsi une macération à 5 p. 100 qu'on agite durant 1 heure.

Les mesures sont effectuées sur les mêmes prises d'essai et dans les mêmes conditions opératoires, précédemment décrites.

TABLEAU VI.

Activité monoestérasique et phytasique de diverses feuilles.

Substrats	β-Glycérophosphate			Inositolhexaphosphate		
	8 j.	10 j.	15 j.	8 j.	10 j.	15 j.
Poireau (feuilles fraîches) suspension au tiers	10,35 (1)			1,65		
Poireau (feuilles fraîches desséchées) suspension à 5 p. 100..			7,4			1,0
Mache (feuilles fraîches) suspension au tiers		13			1,75	
Mache (feuilles fraîches desséchées) suspension à 5 p. 100..			3,5			0,45
Radis sans feuilles suc exprimé	11,6			2,8		
Marronnier d'Inde (suc de feuilles fraîches).		0			1,0	
Marronnier d'Inde suspension au tiers ..		11,7			11,3	
Lilas (feuilles fraîches) suspension au tiers..		2,2			0,9	
Lilas (feuilles fraîches) 0,25 g. dans 50 cm ³ ..		3,8			0,3	
Laurier Cerise (feuilles fraîches) suspension au tiers		11,2	13,0		0,65	1,2

(1) Les chiffres du tableau représentent le nombre de millig. de phosphore libérés sous forme d'acide orthophosphorique à partir des substrats.

Feuilles de Poireau. — La suspension au 1/3 des feuilles fraîches montre après une hydrolyse de 8 jours, une activité monoestérasique beaucoup plus grande que l'activité phytasique.

Il est à remarquer la nécessité presque impérieuse d'une très

longue durée d'hydrolyse. C'est *a priori* un inconvénient notable qui classe d'ores et déjà l'usage des feuilles fraîches comme source phytasique et monoestérasique, dans un rang inférieur à celui des graines végétales.

Les activités de la suspension à 5 p. 100 de feuilles desséchées après une hydrolyse de 15 jours nous montrent à nouveau une plus forte activité monoestérasique que phytasique.

Nous remarquons que malgré la précaution prise de prolonger la durée d'hydrolyse les activités des deux enzymes étudiés parallèlement se sont affaiblies.

Nous préférons quand même ces mesures car, comme nous l'avons déjà dit, elles permettent seules, de pratiquer des essais toujours semblables.

Feuilles de Mache. — Les feuilles vertes et fraîches ayant subi les opérations précédemment décrites nous montrent une activité monoestérasique supérieure à l'activité phytasique étudiée dans les mêmes conditions. La détermination des activités des parties desséchées nous montre la même supériorité d'activité de la monoestérase sur la phytase, mais révèle en même temps un net affaiblissement malgré une durée d'hydrolyse très prolongée. Cette baisse ou plus exactement ce faible taux d'activité des parties desséchées nous entraîne à abandonner notre idée de standardisation pour l'étude des plantes fraîches, par la dessiccation à 37°.

Ce nouveau fait, accentue la médiocrité qu'offrent les feuilles fraîches comme source enzymatique.

Radis frais. — Nous avons classé ici l'étude de l'activité du jus de radis frais, bien que ce ne soient pas des feuilles qui fussent examinées ; dans ce cas nous avons été guidé par un souci d'opportunité d'ordre alimentaire plutôt que morphologique.

L'activité phosphatasique est encore ici supérieure à l'activité phytasique comme nous l'avons constaté par ailleurs dans les graines germées ou non.

Pour ce cas particulier, 200 g. de tubercules de radis frais débarassés des feuilles adjointes ont été écrasés à l'aide d'une presse. Nous avons obtenu un liquide d'odeur caractéristique et changeant assez rapidement de teinte. Les mesures ont été effectuées pour chacun des deux substrats habituellement utilisés avec 5 cm³ du suc ainsi préparé.

Feuilles de Marronnier d'Inde. — Les feuilles fraîches considérées étant particulièrement riches en eau nous avons exa-

miné le suc obtenu par expression de 50 g. de feuilles et nous en avons recueilli 22 cm³. La mesure des activités monoestérasique et phytasique a été faite avec 8 cm³ ; elle nous montre après une hydrolyse de 10 jours une très faible activité phytasique et une absence d'activité monoestérasique. L'activité phytasique ne dépasse pas le cadre des erreurs expérimentales possibles. Elle nous paraît insignifiante pour que nous ne puissions affirmer avoir décelé une préparation de phytase dépourvue de phosphomonoestérasé.

D'ailleurs, l'activité de la suspension de feuilles fraîches de Marronnier d'Inde est venue confirmer notre manière de voir. Après une hydrolyse de 10 jours la suspension au tiers des feuilles fraîches de Marronnier d'Inde a libéré un taux de phosphore du β glycérophosphate supérieur à celui de l'inositohexaphosphate de sodium.

Il faut cependant noter que les activités phytasique et monoestérasique sont assez proches.

L'activité phytasique des feuilles fraîches de Marronnier d'Inde apparaît comme la plus intéressante de toutes celles des plantes fraîches, étudiées dans les mêmes conditions.

L'étude sur les parties desséchées n'a pas été réalisée car elle ne nous avait pas paru concluante lors des essais effectués avec les feuilles desséchées de Poireau et de Mache.

Feuilles de Lilas. — Nous avons mesuré l'activité monoestérasique et phytasique de la suspension au tiers de feuilles fraîches de Lilas, selon les conditions précédemment décrites.

Là aussi, l'activité monoestérasique bien que faible, est quand même supérieure à l'activité phytasique. Nous avons pensé lors de cet essai que si l'activité trouvée s'avérait faible il serait peut-être possible d'obtenir une activité accrue ou notable en pratiquant l'hydrolyse habituelle de 10 jours à l'aide non plus de 10 cm³ d'une suspension au tiers mais en mettant 0,25 g. de feuilles fraîches de Lilas découpées finement, dans les 50 cm³ contenant le substrat, le tampon acétate/acétique et de l'eau toluénée. L'essai s'est avéré infructueux.

Feuilles de Laurier-Cerise. — Nous nous sommes demandé, lors de l'étude de cette plante, si l'acide cyanhydrique libérable des feuilles inhiberait la phytase et partant si le phosphore inositohexaphosphorique serait en quantité notable comme l'avait trouvé MICHEL-DURAND [49].

La mesure des activités monoestérasique et phytasique fai-

tés à partir d'une suspension au tiers comme précédemment nous montre que la phytase manifeste une faible activité et il s'avère possible que l'acide cyanhydrique exerce une action inhibitrice. La phosphatase fait preuve d'une certaine activité et a dû, elle aussi, subir l'influence de l'acide cyanhydrique libéré lors de l'écrasement en particulier.

Nous avons d'ailleurs ultérieurement étudié l'action de l'acide cyanhydrique sur les phytases.

Le phosphore phytinique a été déterminé de la même manière que pour les graines (Chapitre I, p. 26) : différence entre le Phosphore total et le Phosphore minéral des feuilles fraîches stabilisées à deux reprises.

La teneur en Phosphore phytinique s'est révélée plus élevée que celles mentionnées par MICHEL-DURAND [49].

Nous pensons que cet écart tient surtout dans l'absence de stabilisation de l'inositohexaphosphate des feuilles fraîches dans la technique utilisée par cet auteur.

Résultats pour 100 g. de feuilles fraîches :

Phosphore total	91,6 mg.
Phosphore minéral	26,2 mg.

soit Phosphore inositohexaphosphorique ... 65,4 mg.

Les résultats des différents essais ont été groupés dans le tableau VI.

Conclusions. — Les plantes fraîches ne peuvent pas être d'un usage courant pour l'obtention d'une préparation enzymatique particulièrement active sur le β glycérophosphate et l'inositohexaphosphate de Sodium. La durée d'hydrolyse et le mode de préparation trop longs constituent les principaux griefs qu'on leur reprocherait à côté d'autres comme le fait de fournir des préparations médiocrement actives.

Les essais effectués confirment ce que nous avons déjà observé au cours de l'étude des diverses graines : l'activité monoestérasique est presque toujours supérieure à l'activité phytasique et varie indépendamment de celle-ci. Nous n'avons pas décelé de préparations actives sur l'inositohexaphosphate sans l'être sur le β glycérophosphate.

Tous ces faits ainsi rassemblés montrent, dans ce domaine des plantes fraîches, une similitude avec les résultats de l'étude des graines diverses, contribuant ainsi à démontrer plus fortement l'existence de la spécificité phytasique chez les végétaux.

DEUXIÈME PARTIE.

Recherches en vue d'obtenir des matières premières dont l'activité phytasique initiale a été artificiellement accrue.

INTRODUCTION.

Au cours du chapitre précédent nous n'avons pu mettre en évidence de source très active de phytase, en dehors de celles déjà connues. Nous avons donc entrepris des essais en vue d'obtenir des matières premières à activité phytasique accrue.

Dans ce but, nous nous sommes adressés à deux méthodes de principe tout à fait distincts qui, dans certains cas, permettent soit de faire apparaître, soit d'accroître considérablement l'activité d'un enzyme dans un organisme en voie de développement.

1. Nous avons tout d'abord cherché à provoquer l'élaboration de phytase en tant qu'*enzyme d'adaptation*. C'est un fait connu, et dont on connaît de multiples exemples, que certains micro-organismes cultivés sur un milieu renfermant une substance qu'ils ne transforment que lentement ou même pas du tout peuvent élaborer un enzyme ou un groupe d'enzymes susceptibles de transformer la substance.

KARSTRÖM [38] a proposé de dénommer ces enzymes néo-formés ou dont l'élaboration est accrue « *enzymes d'adaptation* ».

Les enzymes d'adaptation se distinguent ainsi des « *enzymes constitutifs* », normalement fabriqués par la matière vivante.

Les tentatives en vue de provoquer l'apparition d'enzymes d'adaptation ont eu principalement pour cadre l'étude des glucides.

La levure cultivée sur un milieu à base de saccharose voit croître nettement l'activité de la sucrase qu'elle élabore. Il a également été possible d'adapter des levures et microorganismes à utiliser et faire fermenter divers sucres : arabinose-galactose, etc.

Il convient cependant de signaler qu'à côté des résultats positifs, plus spécialement retenus par les ouvrages généraux d'enzymologie, les tentatives infructueuses fort nombreuses n'ont pas eu la même publicité.

Nous avons tenté d'accroître l'activité phytasique de l'*Aspergillus niger*, par une série de cultures successives sur un milieu dont la seule source de phosphore était apportée par l'acide inositohexaphosphorique.

2. La germination de certaines graines s'accompagne de l'augmentation considérable de leurs teneurs en certains enzymes. L'exemple le plus classique est celui de l'amylase de l'Orge, cette propriété utilisée empiriquement depuis un temps immémorial a même provoqué la première séparation d'un enzyme : la diastase de PAYEN et PERSOZ.

Diverses recherches de biochimie végétale ont montré que les dérivés inosito-phosphoriques diminuaient au cours de la germination des graines avec parallèlement mise en liberté d'acide orthophosphorique. Nous avons ainsi été amené à étudier l'influence de la germination sur l'activité phytasique des graines.

CHAPITRE I.

Cultures répétées de l'*Aspergillus* sur un milieu renfermant de l'inositohexaphosphate.

Protocole des expériences.

Nous avons utilisé un milieu analogue à celui de RAULIN et possédant la composition suivante :

Saccharose 70 g. — Tartrate acide de potassium 6 g. — nitrate d'ammonium 4 g. — carbonate neutre de potassium 0,60 g. — carbonate de magnésium 0,40 g. — sulfate d'ammonium 0,25 g. — sulfate ferreux 0,07 g. — sulfate de zinc 0,07 g. — silicate de potassium 0,07 g. — eau distillée 1500 cm³. Comme source de phosphore nous avons ajouté soit 0,60 g. d'orthophosphate diammonique (milieu P) soit 1,17 g. d'inositohexaphosphate de sodium cristallisé à 35 OH₂ (milieu I).

Dans deux cuvettes plates en porcelaine, préalablement flambées, nous introduisons 250 cm³ de l'un des deux milieux, stérilisés auparavant à l'autoclave. Nous ensemençons alors la cuvette renfermant le milieu P au phosphate et celle contenant le milieu I à l'inositophosphate avec des volumes égaux d'une suspension aqueuse de spores d'*Aspergillus niger* (1). Les cultures recouvertes par une plaque de verre sont maintenues 3 jours à l'étuve à 37°.

Au terme de ce délai, nous décantons le milieu de culture et y dosons l'acide orthophosphorique après isolement préliminaire sous forme de sel ammoniaco-magnésien. Le mycélium est lavé par décantation avec de l'eau distillée, égoutté, lavé à nouveau. Nous procédons à un dernier lavage en ajoutant de l'eau distillée, maintenue 3 heures en contact avec le mycélium puis soigneusement décantée. Nous introduisons dans la cuvette 250 cm³ d'eau distillée stérile, laissons en contact 24 heures pour que les enzymes solubles (lyoenzymes) puissent y diffuser du mycélium dans ce liquide. Ce mode opératoire a permis à

(1) Nous tenons à exprimer notre gratitude à M. CHARTIER, assistant de Microbiologie qui nous a procuré les souches utilisées.

H. HÉRISSEY [30] de séparer ainsi des préparations de glucidases possédant une activité hydrolysante considérable par rapport au poids d'extrait sec ; nous avons obtenu des résultats moins favorables avec les phosphatases.

Nous déterminons l'activité phosphatasique dans le liquide ainsi préparé par macération en le faisant réagir pendant 10 jours à 37° sur 5 cm³ de substrat M/10 en acide phosphorique estérifié ; l'hydrolyse est réalisée à pH 4,0 en présence de 10 cm³ de tampon citrate de sodium — acide chlorhydrique M/10 ; le volume de liquide final étant de 50 cm³ (1).

Nous utilisons 10 cm³ de liquide de macération avec le glycérophosphate comme substrat et 20 cm³ pour l'inositohexaphosphate.

L'acide orthophosphorique libéré a été dosé selon notre protocole habituel. La faible activité phosphatasique mesurée nous a conduit à rechercher si la majeure partie de ces enzymes ne demeurerait pas liée dans le mycélium sous forme de desmoenzymes.

Le mycélium a été recueilli, desséché dans le vide sulfurique à la température du laboratoire, pulvérisé grossièrement et desséché à nouveau.

Nous en prélevons une partie aliquote dont nous achevons la dessiccation à l'étuve à 100° de façon à connaître le poids de la récolte en mycélium sec.

Nous avons cherché à libérer les desmoenzymes du mycélium par autolyse. Un poids *p* de mycélium desséché à la température du laboratoire est broyé au mortier, puis trituré avec 10 *p* g. d'eau distillée toluénée. Nous plaçons le récipient 10 jours à l'étuve à 37° en agitant fréquemment.

Nous avons déterminé l'activité de 10 cm³ de cette suspension sur chacun des deux sbstrats, dans les mêmes conditions opératoires que pour le liquide de macération.

Ces diverses déterminations furent réalisées en premier lieu avec des cultures de la souche initiale d'*Aspergillus* sur le milieu P aux orthophosphates et le milieu I à l'inositophosphate.

Par la suite nous avonsensemencé les milieux de culture I et P avec des volumes égaux de suspension aqueuse de spores récoltées après la première culture sur le milieu I. Ces essais avaient comme but de rechercher si l'*Aspergillus* cultivé sur

(1) Nous avons réalisé ces essais à pH 4,0 plus favorable à l'action des enzymes d'*Aspergillus* (chapitre I, p. 19).

milieu I avait acquis une activité phytasique accrue persistant au cours d'une nouvelle culture sur les milieux I et P.

Des spores recueillies après la deuxième culture successive sur le milieu I furent ensemencées sur les milieux I et P et ainsi de suite avec les spores provenant de cultures successives sur le milieu I.

Discussion des résultats.

Nous avons rassemblé dans le tableau VII les résultats obtenus.

TABLEAU VII.

Déterminations effectuées sur les Aspergillus cultivés sur des milieux dont la source de phosphore est soit un orthophosphate (milieu P) soit un inositolphosphate (milieu I).

Série d'essais	Nombre de cultures successives sur le milieu I avant l'ensemencement	Milieu de culture	Poids du mycélium desséché (g.)	Mg. de P retrouvés sous forme d'orthophosphates dans 100 cm ³ du milieu de culture	Activité du liquide de macération (1)		Activité de l'autolysat de mycélium (1)	
					Glycérophosphate	Inositolphosphate	Glycérophosphate	Inositolphosphate
1	0	I P	24,5	0	8,7	2,4	10,7	8,2
			35,0	0	7,4	2,6	6,4	5,7
2	1	I P	5,0	0	1,2	3,5	13,0	14,2
			15,0	7,2	3,5	2,2	13,7	14,4
3	2	I P	5,4	3,5	13,5	3,5	8,0	2,0
			4,3	5,25	12,8	0,9	8,7	1,3
4	3	I P	2,4	0,5	10,5	2,6	4,9	1,0
			1,5	5,0	11,5	0,7	3,2	2,8
5	4	I P		0,5	12,0	2,0		
				5,0	13,5	3,2		

(1) Activités exprimées en millig. de P libéré sous forme de PO_4H_3 selon les conditions expérimentales précisées dans le texte.

Durée d'hydrolyse à 37° : a) pour le liquide de macération : 7 jours essai 1 ; 10 jours essais 2-3-4-5 ; b) suspension autolysée ; essais 1 et 2, 7 jours ; essais 3 et 4, 5 jours.

Nous examinerons séparément les chiffres fournis par les diverses déterminations.

1) RENDEMENT EN MYCÉLIUM.

Ce rendement s'affaiblit progressivement au cours des cultures successives ; le développement de la cinquième culture a été insignifiant. Cet affaiblissement peut être attribué à l'absence de facteurs de croissance (à l'exception de l'inositol) dans nos milieux. Le but de nos recherches était plus spécialement la comparaison des activités phosphatasiques de cultures successives ; nous n'avons donc pas jugé utile d'additionner le milieu de culture de facteurs de croissance, nous avons en effet pensé que l'*Aspergillus*, placé dans des conditions défavorables de culture, se trouverait plus apte à réagir et élaborer des enzymes d'adaptation. Lors des deux premières cultures le milieu P aux orthophosphates s'est révélé être le plus favorable. Pour les cultures ultérieures le milieu I a fourni des rendements supérieurs ; il est possible que, croissant dans des conditions moins favorables, l'*Aspergillus* se soit montré plus sensible à l'action favorisante de l'inositol, facteur de croissance libéré par hydrolyse de l'inositophosphate dans le milieu I.

2) UTILISATION DU PHOSPHORE.

Il est assez délicat d'interpréter les chiffres fournis par le dosage de l'acide orthophosphorique présent dans le milieu de culture après développement de l'*Aspergillus*. Nous retiendrons cependant le fait que dans les essais 3-4 et 5 le champignon a hydrolysé l'inositophosphate du milieu de culture.

3) ACTIVITÉS PHOSPHATASIQUES.

Nous ne pouvons relever de grands écarts entre les activités glycérophosphatasiques des liquides obtenus par macération du mycélium. Pour une même série de cultures les différences entre l'action hydrolysante du liquide obtenu avec un mycélium croissant sur le milieu P et celle à partir du mycélium développé sur le milieu I sont des plus minimales.

Ces remarques peuvent également être généralisées à l'activité phytasique ; il convient cependant de remarquer que dans les essais 3 et 4 l'activité phytasique est nettement plus élevée à partir du milieu I qu'à partir du milieu P. L'inverse se manifestant pour l'essai 5, ces différences ne paraissent pas avoir un caractère régulier. Les essais réalisés avec la suspension de mycélium autolysé permettent de tirer des conclusions sensi-

blement identiques. Les cultures successives sur le milieu I ne paraissent pas accroître ni l'activité glycérophosphatasique, ni l'activité phytasique.

Par ailleurs, pour les cultures avec la même souche le milieu I ne paraît pas plus favorable à l'élaboration des enzymes que le milieu P. KARSTRÖM [38] considère que pour conclure à l'élaboration d'un enzyme d'adaptation l'activité des cultures obtenues sur un milieu contenant le corps à transformer doit être au moins cinq fois supérieure à celle des cultures sur le même milieu dépourvu du corps dont on désire provoquer la transformation.

Au cours de nos essais l'inositophosphate ne paraît pas avoir provoqué l'élaboration par l'*Aspergillus* de phytase, enzyme d'adaptation aussi bien sous forme de lyoenzyme que sous celle de desmoenzyme.

Conclusions de ce Chapitre. — La culture de l'*Aspergillus* sur milieu de Raulin dont la seule source de phosphore est l'inositohexaphosphate n'a pas provoqué l'élaboration d'une phytase en tant qu'enzyme d'adaptation.

CHAPITRE II.

Influence de la germination sur le développement de l'activité phytasique.

Les divers auteurs paraissent d'accord pour estimer qu'au cours de la germination des graines on observe parallèlement une diminution du taux des inositohexaphosphates et un accroissement de celui des orthophosphates.

Des comportements analogues furent observés avec les graines de : Blé, BERNARDINI et MORELLI [5] ; Avoine, ALBAUM et UMBREIT [3] ; Maïs, DE TURCK-HOLBERT et HOWK [70] ; Riz, GIRI et SREENIVASAN [29] ; Gland du Chêne, MICHEL-DURAND [49] ; Fève, IWANOFF [35] ; Pois-chiche, ZLATAROFF [71] ; Lentille, COLIN [8].

Dans le Riz cette diminution très importante les deux premiers jours, se poursuit plus lentement jusqu'au 7^e jour. Dans la lentille l'acide phytique a disparu après 9 jours de germination, le plus net abaissement se manifeste du 3^e au 6^e jour.

A notre connaissance, il n'a jamais été réalisé d'essais systématiques sur l'évolution de l'activité phytasique au cours de la germination. Tout au plus ALBAUM et UMBREIT [3] signalent incidemment que l'activité phytasique de l'Avoine augmente dans ces conditions.

Il était tentant de relier la disparition des inosito-phosphates avec libération d'acide orthophosphorique à un accroissement de l'activité phytasique au cours de la germination ; en effet les graines d'Avoine, Maïs, Riz à l'état de repos ne possèdent que des phytases peu actives et cependant se comportent au cours de la germination, ainsi que nous venons de l'indiquer, comme les graines à phytase très active, le Blé par exemple.

Influence de la germination sur l'activité glycérophosphatasique et phytasique de diverses graines.

Les essais groupés dans le tableau VIII ont été réalisés avec des graines humectées puis placées à l'étuve à 25° pendant deux jours au moins (1).

Nous avons déterminé l'activité des graines germées comme celle des graines non germées du tableau IV (p. 29). Avec les graines étudiées la germination a provoqué un faible accroissement de l'activité glycérophosphatasique ; par contre, l'action hydrolysante sur l'inositohexaphosphate a augmenté d'une façon bien plus notable.

TABLEAU VIII.

Activité glycérophosphatasique et phytasique de diverses graines germées.

Origine de la graine germée	Activité glycérophosphatasique (1)		Activité phytasique (1)	
	4 j.	10 j.	4 j.	10 j.
Bromus pratensis... } non germé .	0,65		traces	
} germé.....	4,8	7,0	1,0	2,8
Dactylis glomerata . } non germé .		11,2	0,11	1,6
} germé.....	8,3	9,4	1,1	1,4
Raphanus Sativus... } non germé .	3,4	6,8	1,2	2,0
} germé.....	12,75		8,2	
Phaseolus lunatus... } non germé .		8,0	0,64	0,64
} germé.....		10,4	0,86	6,5

(1) Substrat β glycérophosphate (glycérophosphatase) ou inosito-hexaphosphate (phytase) mg. de P libérés sous forme de PO_4H_3 du substrat à 37° après 4 jours et 10 jours d'hydrolyse (15,5 mg. de P organique dans les substrats).

Nous sommes à même d'observer que la germination provoque un accroissement de l'activité diastasique. Nous nous sommes préoccupés de préciser le mécanisme de cette activation à l'aide de graines de Radis (*Raphanus Sativus* Crucifères) variété de Sézanne, rond rose à grand bout blanc de la firme Vilmorin.

(1) Ces essais de germination ont pu être menés à bien grâce aux précieux conseils de M. le Professeur HÉRISSEY. Nous lui exprimons nos respectueux remerciements et notre profonde gratitude.

Influence de la durée de germination sur le développement des activités phosphatasiques de la graine de Radis.

Nous avons essayé de caractériser l'activité maxima en fonction du temps de germination.

Nous avons pour cela suivi un protocole opératoire assez strict. Dans une série de cristallisoirs identiques nous avons placé dans chaque 5 g. de graines saines triées et pesées avec soin, et les avons laissées en contact avec de l'eau distillée bouillie, durant 48 heures à 25°. Après ce temps, nous avons enlevé l'eau en nous aidant pour les dernières gouttes d'une pipette effilée. Ces graines ainsi humectées sont laissées dans l'étuve réglée à 25° ; tous les jours, nous prélevons la totalité du contenu de l'un des cristallisoirs et mesurons l'activité des graines en cours de germination.

Nous avons mesuré l'activité des graines à l'état de repos avant toute macération et germination (essai au temps zéro). Nous mesurons ensuite l'activité des graines après deux jours de macération. Enfin tous les jours pendant la germination étendue sur une semaine.

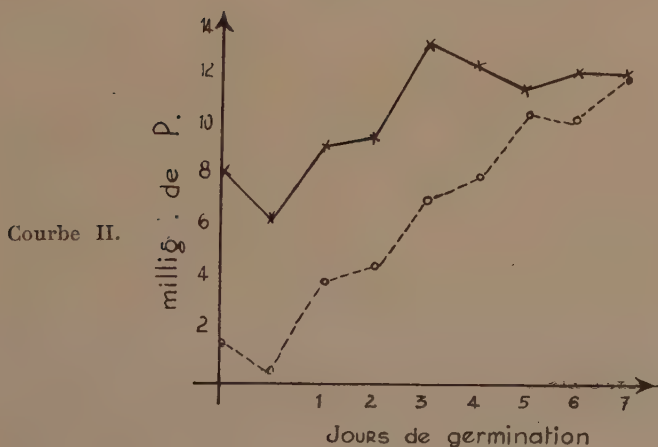
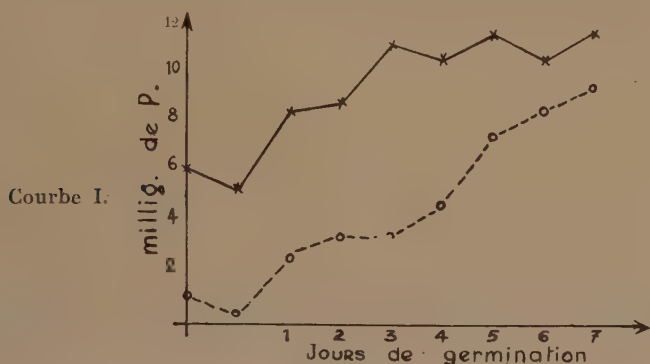
La totalité du prélèvement au repos avant germination correspondant à 5 g. de graines, est écrasé et réduit en une pâte très fine au mortier puis mis en suspension dans 100 cm³ d'eau distillée toluénée ; nous agitons ensuite à la machine

TABLEAU IX.

Activités monoestérasique et phytasique des graines de Radis au cours de la Germination.

Origine de l'enzyme		Graines initiales	Graines après 2 jours de macération	Durée de la germination (en jours)						
				1	2	3	4	5	6	7
Hydrolyse de 48 heures	Activité Monoestérasique ..	6,1	5,25	8,3	8,5	11,0	10,4	11,4	10,1	11,5
	Activité phytasique	1	0,3	2,7	3,5	3,5	4,7	7,4	8,3	9,2
Hydrolyse de 96 heures	Activité Monoestérasique ..	8,3	6,6	9,5	9,75	13,6	2,7	11,8	12,3	12,3
	Activité phytasique	1,7	0,4	4	4,7	7,3	8,2	10,9	10,6	12,3

pendant une heure. Après expression sur toile fine et filtration sur papier à la glacière, nous prélevons 5 cm³ de filtrat et les faisons agir, dans les conditions habituelles, sur le β glycérophosphate de sodium, nous prélevons de même 10 cm³ de filtrat pour l'essai avec l'inositohexaphosphate.



Développement des activités glycérophosphatase et phytase au cours de la germination.

Abcisses : Durée de la germination en jours.

Ordonnées : Milligrammes de Phosphore libérés sous forme d'acide orthophosphorique dans nos conditions expérimentales.

Courbe I : Hydrolyse de 48 heures.

Courbe II : Hydrolyse de 96 heures.

Glycérophosphatase courbe en traits pleins. Phytase courbe en pointillé.

Les durées d'hydrolyse sont de 48 heures et 96 heures à 37°. Les résultats de nos mesures sont groupés dans le tableau IX.

Le graphique montre bien l'accroissement de l'activité phytasique et glycérophosphatasique au cours de la germination.

Après sept jours de germination les graines ont atteint un stade difficilement dépassable dans les conditions de l'expérience, d'ailleurs l'activité diastasique croît bien plus lentement à partir du 5^e jour de germination que dans les tous premiers jours.

DISCUSSION DES RÉSULTATS.

Cette germination met en évidence deux faits saillants : une assez surprenante baisse d'activité après les deux jours de macération initiale et un développement considérable de l'activité diastasique après 7 jours de germination.

Nous avons vérifié dans un essai identique le résultat fourni après la macération initiale. Sa confirmation nous entraîne à émettre les hypothèses suivantes pour interpréter le phénomène.

1) La baisse d'activité constatée pourrait être due à l'élimination de la majeure partie des lyoenzymes de la graine par diffusion dans le liquide de macération.

Par la suite, la germination provoquerait le démasquage d'autres enzymes vraisemblablement liés à des constituants cellulaires, il serait possible d'interpréter ainsi le regain d'activité dès les premiers jours de la germination.

2) Cette diminution d'activité est peut être attribuable à l'apparition d'inhibiteurs des enzymes.

3) Enfin il est plausible que cette baisse d'activité soit due à une dénaturation réelle des enzymes libres de la graine, par séjour prolongé dans de l'eau non pas à basse température mais à 25° ; comme dans le cas de la première hypothèse, la germination viendra par la suite, suppléer à cette perte.

C'est la première hypothèse qui nous apparaît de loin comme la plus plausible.

Le second fait caractéristique, et d'un intérêt plus grand, tient dans le développement considérable de l'activité phosphomonoestérasique et phytasique après 6 à 7 jours de germination. L'accroissement d'activité observé est bien plus élevé pour la phytase que pour la monoestérase.

La germination se traduit par une augmentation de l'activité sur le glycérophosphate qui paraît atteindre son maximum après trois jours.

L'activité phytasique croît par contre d'une façon plus nette et plus régulière, c'est ainsi que la teneur en phytase augmente encore entre les 6° et 7° jours de la germination.

Pour les essais réalisés après une durée d'hydrolyse de 48 heures, la phytase des graines ayant germé 7 jours est 9 fois plus active que celle des graines initiales à l'état de repos et 27 fois plus élevée que celle des mêmes graines après la période initiale d'humectation.

Avec les essais après hydrolyse de 96 heures les graines ayant germé pendant 7 jours présentent une activité phytasique 7 fois supérieure à celle des graines initiales et 30 fois plus élevée que pour ces mêmes graines après la macération du début.

Les résultats obtenus par germination dépassent de beaucoup, comme nous le verrons par la suite, tous ceux utilisés pour parvenir à un accroissement notable de l'activité phytasique.

Le rapport que nous avons proposé pour représenter la possibilité d'utilisation du Phosphore dans une graine :

mg. de P libérés par la Phytase

mg. de P inositohexaphosphorique dans 1 g. de graines

prend une acuité nouvelle et il n'est guère exagéré de penser que l'usage du mélange graines germées (augmentation de la phytase et diminution des inositohexaphosphates rachitigènes) avec graines non germées (Phytase non accrue et inositohexaphosphates non diminués) en diététique alimentaire serait ainsi amené à prendre un certain essor.

Conclusions. — La germination des graines de Radis se traduit par une nette augmentation de leur activité sur le glycérophosphate et par un accroissement considérable et régulier de leur activité phytasique.

CHAPITRE III.

Action de la Pepsine et de la Papaïne sur la Glycérophosphatase et la phytase des Graines.

Dans cette étude nous avons voulu rechercher si les enzymes apparaissant lors de la germination préexistaient masqués dans la graine en repos ou s'ils étaient élaborés au cours de la germination.

Dans une revue générale sur les amylases de l'Orge HESSE [31] a rassemblé les résultats des recherches de nombreux auteurs sur l'augmentation de l'activité diastasique au cours de la germination. Ce problème présente un grand intérêt industriel. Les résultats obtenus par FORD, LÜERS, WALDSCHMIDT, LEITZ, etc... [31] [28] tendent à montrer que l'amylase préexiste dans la graine d'Orge au repos. Elle s'y trouve sous une forme inactive et insoluble, très vraisemblablement liée à des protéines. L'action des protéases végétales (protéases de l'Orge ou papaïne) provoque en effet régulièrement l'apparition d'amylase sous forme active et soluble.

SYNIEWSKI [31] a montré que la germination n'amène pas une mise en liberté d'amylase en quantité supérieure à la libération réalisée par la papaïne.

Tout se passe donc comme si la germination de l'Orge ne provoquait que le déblocage d'un enzyme préformé [1].

I. — Action de protéases sur les Enzymes partiellement purifiés du Radis.

ACTION DE LA PEPSINE.

Nous avons ainsi été amenés à rechercher si, comme pour l'amylase d'Orge, les protéases pouvaient démasquer un enzyme préformé dans les graines de Radis au repos. Nous avons

(1) Il convient de remarquer que la germination de l'Orge ne provoque pas de modification appréciable de l'activité des protéinases et peptidases de cette graine.

tout d'abord recherché si les protéases comme la pepsine ou la papaïne inactivaient la phytase ou la phosphomonoestérase extraites du Radis. Nous avons ensuite procédé à des essais pour voir si ces protéases étaient susceptibles de libérer des phosphatases masquées dans la graine au repos.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE.

0,50 g. de préparation diastasique obtenue par extraction aqueuse et précipitation acétonique à partir de graines de Radis au repos sont mis en suspension, par agitation mécanique dans 50 cm³ de solution tampon de pH 3,5 constitué par le mélange de 50 cm³ de phtalate acide de potassium M/5 avec 5,97 cm³ d'acide chlorhydrique M/5 puis dilution à 200 cm³.

Nous ajoutons alors 0,10 g. de pepsine officinale du Codex et nous complétons à 100 cm³ avec de l'eau distillée. Nous laissons le mélange en contact durant 6 heures à 37°.

Dosage des groupements aminés libérés.

Avant et après ce séjour à l'étuve nous dosons sur 10 cm³ l'azote amino-ammoniacal selon la méthode de SÖRENSEN en utilisant la technique de MESTREZAT [47]. Cette dernière est basée sur la réaction du formaldéhyde en excès sur les acides aminés, elle permet ainsi la titration de leur fonction acide en présence de phénol-phtaléine ou de phénol-sulfone-phtaléine.

Nous préparons un témoin pour comparer les colorations ; nous additionnons de Soude N/10 10 cm³ de formaldéhyde du Commerce mélangé à de l'eau distillée bouillie et X gouttes de phtaléine à 1 p. 100. Cette addition goutte à goutte donne une coloration d'abord rose pâle et enfin après addition supplémentaire de 0 cm³ 40 une teinte rouge franc type. Le titrage avec le formol consiste à ajouter à 10 cm³ de la prise d'essai X gouttes de phtaléine et de la soude N/10 jusqu'à coloration rose pâle. D'autre part dans un autre flacon nous mesurons 10 cm³ (à l'éprouvette) de formol, 1 goutte de phtaléine et de la soude N/10 pour amener à une teinte rose pâle. Nous mélangeons brusquement les 2 liquides puis à l'aide d'une burette graduée nous ajoutons de la soude N/10 d'abord jusqu'à teinte rose persistante puis, à partir de ce moment par II gouttes à la fois, nous poussons la teinte jusqu'à obtention de la teinte rouge correspondant à celle du témoin. Le chiffre obtenu est

corrigé par diminution de 0 cm³ 40 de soude N/10 employée pour colorer le témoin.

Ce dosage est effectué à deux reprises :

a) dès la mise en contact de l'enzyme du Radis et de la pepsine.

b) après 6 heures de contact à 37°.

La différence observée représente la quantité d'azote aminé libéré après action de la pepsine.

Pour une différence de 0,1 cm³ trouvée le poids d'azote aminé correspondant est : $0,1 \times 0,014 \times 100 = 0,1 \times 0,14 = 0,014$ g. d'azote par litre.

Détermination de l'activité diastasique.

La détermination de l'activité phosphatasique et phytasique par les procédés habituels sera effectuée sur 10 cm³ et 20 cm³ de suspension amené à pH 5,2 par addition de 10,8 cm³ de NaOH N/10 aux 30 cm³ de liqueur restante et que nous complétons à 60 cm³ par de l'eau distillée.

Discussion des résultats.

Les résultats sont groupés dans le Tableau X. Ils montrent que la pepsine a légèrement inactivé la phytase et d'une manière plus sensible la phosphomonoestérase. Nous pouvons aussi remarquer que la pepsine a une forte activité monoestérasique et une faible activité phytasique. Nous en avons tenu compte dans nos calculs, la faible libération d'azote aminé montre le peu d'action de la pepsine sur les protéines présentes à côté des enzymes étudiés.

ACTION DE LA PAPAINE.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE.

Nous avons répété les opérations précédentes en substituant à la pepsine de la papaine additionnée de 5 cm³ d'acide cyanhydrique N/10 et en remplaçant le tampon de pH 3,5 par celui donnant un pH de 6,0 constitué par le mélange de 50 cm³ de phtalate acide de potassium M/5 avec 45,4 cm³ de soude M/5 amené à 200 cm³ par addition d'eau distillée,

TABLEAU X.

*Activités monoestérasiqne et phytasiqne de diverses préparations
après action de la Pepsine et de la Papaine.*

Origine de l'Enzyme	Protéase utilisée	Activité mesurée	I	II	III	IV	V
Enzymes partiellement purifiés du Radis	Pepsine	Monoestérasiqne	0,044	41,3 (4)	4,5 (4)	42,5 (4)	8 (4)
		Phytasiqne		4,0 (4)	0,5	4,0	3,5
	Papaine	Monoestérasiqne	0,028	9,35 (4)	2,2 (4)	7,4 (4)	4,9 (4)
		Phytasiqne		4,9 (4)	0,1	2,4	2,0
Poudre de graines de Radis	Pepsine	Monoestérasiqne	0,028	5,4 (4)	2,85 (4)	8,5 (4)	4,45 (4)
		Phytasiqne		1,2 (4)	0,1	4,4	4,0
	Papaine	Monoestérasiqne	0,034	4,5 (4)	2,2 (4)	4,5 (4)	2,3 (4)
		Phytasiqne		0,5 (4)	0,1	0,4	traces
Enzymes partiellement purifiés du Seigle	Pepsine	Monoestérasiqne	0,056	5,25 (4)	2,85	3,35	0,5
		Phytasiqne		5,0 (4)	traces	5,4	5,0
	Papaine	Monoestérasiqne	0,049	0,4 (4)	traces	0,45	0,4
		Phytasiqne		traces (4)	0	traces	traces
Poudre de graines de Seigle	Pepsine	Monoestérasiqne	0,056	0,9 (4)	2,85	0,8	traces
		Phytasiqne		0,1 (4)	traces	0,05	0,05
	Papaine	Monoestérasiqne	0,034	0,22 (4)	traces	0,45	0,23
		Phytasiqne		traces	0	traces	traces

Colonne I. — Azote aminé libéré exprimé en g. pour 1 litre de préparation.

Colonne II. — Activité des enzymes avant action des protéases.

Colonne III. — Action hydrolysante des protéases sur le glycérophosphate et l'inositolhexaphosphate.

Colonne IV. — Activité monoestérasiqne et phytasiqne après action de la protéase.

Colonne V. — Activité calculée de l'enzyme végétal après action de la protéase soit (IV-III).

(1) Substrat β Glycérophosphate (glycérophosphatase) ou inositolhexaphosphate (phytase) mg. de P libérés sous forme de PO_4H_2 du substrat à 37° après 48 heures d'hydrolyse par 10 cm³ de suspension d'enzymes pour le cas des phosphomonoestérases du Radis exclusivement et 20 cm³ de suspension d'enzymes pour tous les autres cas.

Les 30 cm³ de suspension restante après le dosage de l'azote aminé sont ajustés à pH 5,2 par addition de 10,35 cm³ d'acide chlorhydrique N/5 puis complétés à 60 cm³ par de l'eau distillée. Les déterminations des activités phytasique et phospho-monoestérasique sont effectuées sur les mêmes prises d'essai que pour le cas de la pepsine.

Discussion des Résultats.

La papaïne n'a pas inactivé la phytase par contre la phospho-monoestérase l'a été notablement. La papaïne, pratiquement sans activité phytasique, présente une activité monoestérasique non négligeable.

La minime libération d'azote amino-ammoniacal montre le faible pouvoir protéolytique dans le cas présent.

II. — Action des protéases sur la poudre de graines de Radis.

Nous avons préparé une poudre de graines de Radis au repos, délipidée par l'éther par lixiviation durant une dizaine de jours.

ACTION DE LA PEPSINE.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE.

Un gramme de cette poudre est mis en suspension dans 50 cm³ de solution tampon de pH 3,5 en présence de 0,10 g. de pepsine. Nous utilisons les techniques opératoires précédemment décrites afin de mesurer les activités monoestérasique et phytasique de la préparation. Avec les mêmes prises d'essai et la même durée opératoire, nous constatons un léger fléchissement des activités monoestérasique et phytasique. La baisse observée est identique à celle qui a eu lieu dans le cas des enzymes précipités par l'acétone et soumis à l'action de la pepsine : très faible diminution de l'activité phytasique et diminution plus accentuée, de l'activité monoestérasique. Ces variations sont accompagnées d'une faible libération d'azote aminé.

ACTION DE LA PAPAÏNE.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE.

Nous avons recommencé les expériences précédentes en utilisant à la place de la pepsine de la papaïne additionnée de 5 cm³ d'acide cyanhydrique N/10 amené à pH 6,0 par de la soude N/10 ; et en employant le tampon de pH 6,0 au lieu du tampon de pH 3,5. Nous constatons une faible libération d'azote aminé et une inhibition assez marquée des activités monoestérasiqne et phytasiqne à la suite de ce traitement.

Nous n'observons donc, pas là encore un démasquage hypothétique des enzymes contenus dans la graine de Radis.

Conclusions. — Dans les conditions où nous avons opéré les protéases exercent une légère inactivation des enzymes partiellement purifiés du radis. Cette inactivation est un peu plus marquée pour la phosphomonoestérase que pour la phytase.

Avec la poudre de graines de Radis les deux protéases ne paraissent pas démasquer d'enzymes bloqués.

Action des Protéases sur les enzymes partiellement purifiés du Seigle.

Cette graine est d'un emploi courant dans l'alimentation du bétail. Nous avons déjà signalé l'activité considérable, qu'elle manifeste du point de vue phytasiqne. L'étude de son comportement vis à vis de la pepsine et de la papaïne offre un double intérêt : poursuite du but que nous nous sommes proposés en étudiant la graine de Radis et connaissance du sort probable de la phosphomonoestérase et de la phytase durant le séjour dans l'appareil digestif du bétail.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE.

Nous avons réalisé tout d'abord des essais sur une préparation purifiée par extraction aqueuse et précipitation acétonique, nous mettons en suspension 0 g. 30 de poudre d'enzymes dans 50 cm³ de solution tampon soit de pH 3,5 pour le cas de la pepsine, soit de pH-6,0 (avec addition d'acide cyanhydrique M/10) pour le cas de la papaïne. Nous avons utilisé les mêmes techniques opératoires que pour l'étude du Radis.

ACTION DE LA PEPSINE.

La détermination des activités monoestérasique et phytasique après traitement à la pepsine montre une bien plus notable diminution de l'activité monoestérasique que celle constatée dans l'étude du Radis ; nous constatons également que l'activité phytasique n'est que très peu influencée par la pepsine.

Ce résultat est important pour la connaissance du sort de la phytase dans l'estomac des ruminants et autres Mammifères se nourrissant de ces graines.

ACTION DE LA PAPAÏNE.

L'utilisation des techniques opératoires précédentes nous amène à envisager dans le cas de la papaïne un rôle inhibiteur des phosphatases que jouerait l'acide cyanhydrique utilisé comme activateur de la papaïne. Nous ne notons pas une disparition radicale des activités phosphatasiques qui se sont au contraire maintenues après le traitement à la papaïne, mais dont leurs faibles valeurs, dues à l'acide cyanhydrique, amoindrissent la portée.

Action des Protéases sur la poudre de graines de Seigle.

ACTION DE LA PEPSINE.

Nous avons mis en suspension 1 g. 50 de poudre de graines de Seigle dans 50 cm³ de solution tampon de pH 3,5 pour le cas de la pepsine que nous avons ajouté exactement de même manière que précédemment.

Il ressort nettement que le contact de 6 heures à l'étuve a provoqué une nette inactivation des phosphatases. Nous verrons par la suite, lors de l'étude des effecteurs que les enzymes du Seigle sont particulièrement fragiles. La libération d'azote aminé n'est pas notable.

Nous pouvons néanmoins observer qu'il n'y a pas de démasquage d'activité enzymatique par action de la pepsine. La phytase paraît être moins fortement inactivée que la phosphomonoestérase.

ACTION DE LA PAPAÏNE.

Là aussi nous constatons une valeur très basse des activités phosphoestérasique et phytasique des enzymes de la poudre de Seigle à la suite du traitement par la protéase ; la libération d'azote aminé est aussi très faible.

Conclusions. — Il semble dans ces essais réalisés avec la poudre de Seigle que la papaïne et la pepsine inactivent les phytases et les phosphomonoestérases de la graine. Il est très difficile de tirer des conclusions étendues de nos résultats.

Une seule conclusion paraît être certaine, les protéases n'ont pas démasqué de phosphomonoestérase ni de phytase dans la poudre de Seigle.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

La pepsine et la papaïne n'ont pas fait apparaître d'enzymes dissimulés dans les graines au repos du Radis et du Seigle. L'accroissement très marqué des activités phosphomonoestérasique et phytasique observé au cours de la germination paraît provenir d'une élaboration des enzymes plutôt que de leur démasquage.

Un autre fait important a été également constaté ; la très faible influence de la pepsine sur la phytase de la graine de Radis.

TROISIÈME PARTIE.

Etude particulière de deux phytases de graines

INTRODUCTION.

Nous avons complété nos recherches en étudiant plus spécialement deux préparations actives de phytase des graines. Nous avons porté notre choix sur les enzymes du Radis et du Seigle. Dans le cas du Radis nous avons désiré comparer les phosphatases des graines au repos à celles beaucoup plus actives de la graine germée. Nous nous proposons de rechercher ainsi si l'activité phosphatasique développée au cours de la germination présentait des caractères similaires à ceux des phosphatases de graines non germées.

Pour ces trois préparations (Radis germé et non germé, Seigle), nous avons cherché à séparer la phytase de l'enzyme agissant sur les monoesters comme les glycérophosphates. Dans ce but, nous avons appliqué aux préparations diastasiques les principales méthodes de purification et séparation des enzymes : relargage par les solutions salines — précipitation fractionnée par les solvants organiques — essais d'adsorption et élution plus ou moins sélective.

Nous avons complété ces essais en tentant de séparer les deux enzymes par inactivation thermique fractionnée ; nous avons également étudié l'action de divers effecteurs chimiques sur l'hydrolyse de l'inositophosphate et celle du glycérophosphate.

Tous ces essais nous ont fourni des résultats analogues à ceux obtenus par J. COURTOIS avec le Blé [12] ou la Moutarde-Blanche [13].

Tout se passe comme si ces deux graines, de même que cel-

les de Radis et Seigle renfermaient au moins deux fractions phosphatasiques.

a) Une *phosphomonoestérase banale* active sur le glycérophosphate et inactive sur l'inositohexaphosphate.

b) Une *phytophosphatase*, enzyme à champ d'action plus étendu susceptible d'hydrolyser ces deux substrats.

Nous avons précisé cette hypothèse dans le 1^{er} chapitre (p. 21).

CHAPITRE I.

Essais de purification et de fractionnement des phosphatases du Radis non germé.

1) Précipitation par l'acétone.

100 grammes de graines de Radis sont pulvérisées tout d'abord à l'aide d'un moulin, nous complétons la pulvérisation dans un mortier. Nous délayons la poudre obtenue dans 500 cm³ d'eau distillée additionnée de toluène, soumettons à une agitation mécanique d'une heure et laissons macérer 24 heures à la glacière. Nous exprimons à travers un linge puis clarifions le liquide soit par filtration sur papier à la glacière, soit par centrifugation. Le liquide obtenu refroidi à 0° est versé dans 4 parties d'acétone également refroidie à 0°.

Après avoir laissé sédimenter le précipité pendant une heure à la glacière, nous le recueillons soit par filtration sur Büchner, soit par centrifugation.

Dans l'un et l'autre cas le précipité est lavé successivement par 20 cm³ d'un mélange éther-acétone à parties égales puis par 20 cm³ d'éther.

La préparation obtenue est desséchée dans le vide sulfurique, pulvérisée puis desséchée à nouveau jusqu'à poids constant dans le vide sulfurique à la température du laboratoire. Nous obtenons en moyenne un rendement de 4 p. 100 en préparation diastasique.

DÉLIPIDATION DE LA POUDRE DE RADIS.

La poudre de Radis qui a permis l'extraction précédente est riche en huile, son utilisation est plus délicate, en particulier dans la filtration et dans la tamisation.

Nous avons alors été amené à opérer l'extraction des enzymes sur la poudre délipidée. La poudre obtenue après pulvérisation au moulin est lixiviée durant 10 jours avec de l'éther à la température du laboratoire, jusqu'à disparition de la colo-

ration verte du solvant qui s'écoule, la pâte obtenue est desséchée à l'air libre puis à l'étuve à 37°. Nous la pulvérisons à nouveau et nous utilisons cette poudre délipidée pour l'extraction aqueuse et la précipitation acétonique à la place de celle indiquée plus haut.

Cette délipidation préalable, permettrait aux lyoenzymes de mieux diffuser.

L'activité de la préparation diastasique obtenue est mesurée en préparant une suspension à 1/100 dans de l'eau toluénée. Après agitation mécanique d'une demi-heure puis centrifugation, nous faisons agir 5 cm³ du liquide surnageant sur 5 cm³ de glycérophosphate M/10 à pH 5,2 ou 13 cm³ de la suspension centrifugée sur 5 cm³ d'inositohexaphosphate M/10 (1) à pH 5,2.

Dans ces conditions opératoires, et après 48 heures d'hydrolyse à 37° le β glycérophosphate a libéré 6 mg. de Phosphore et l'inositohexaphosphate en a libéré 2,85 mg.

2) Relargage au sulfate d'Ammonium.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE.

Nous pulvérisons très finement au moulin, puis au mortier 10 g. de graines et les mettons en suspension dans 100 cm³ d'eau distillée toluénée. Après contact de 24 heures à la glacière et agitation mécanique durant une heure, nous exprimons fortement puis filtrons ou centrifugeons. Nous déterminons l'activité des enzymes contenus dans le filtrat avec des prises d'essai de 1 cm³ pour le β glycérophosphate M/10 et de 5 cm³ pour l'inositohexaphosphate M/10 (en acide phosphorique estérifié) ; l'hydrolyse dure 48 heures à 37°.

Dans ces conditions opératoires le β glycérophosphate a libéré 1,3 mg. de Phosphore et l'inositohexaphosphate en a libéré 0,45 mg.

Le liquide surnageant de volume V refroidi à la glacière est additionné de $\frac{V}{2}$ cm³ de la solution saturée de sulfate d'ammonium également refroidie pour obtenir 33 p. 100 de saturation dans le mélange des deux liquides. Nous laissons le précipité se déposer pendant 30 minutes à la glacière.

(1) En acide phosphorique estérifié.

Par centrifugation nous séparons un premier précipité dont nous mesurerons l'activité par la suite.

Le liquide surnageant de volume V' cm³ est refroidi et additionné de $\frac{V}{3}$ cm³ de solution saturée de sulfate d'Ammonium également refroidie à 0° pour avoir 50 p. 100 de saturation dans le mélange des deux liquides.

Après contact à 0° durant une demi-heure nous centrifugeons et recueillons le précipité obtenu. Le liquide surnageant refroidi est additionné d'un demi volume de solution de sulfate d'ammonium à saturation pour avoir 66 p. 100 de saturation. Comme précédemment le mélange est maintenu une demi-heure à 0° et centrifugé. Le précipité ainsi obtenu est recueilli et le liquide surnageant est trituré au mortier avec des cristaux de sulfate d'ammonium jusqu'à saturation. Après contact d'une demi-heure à 0° le mélange est centrifugé et nous recueillons le dernier précipité obtenu.

Les différents précipités obtenus au cours de ces relargages fractionnés à des taux divers en sulfate d'ammonium, sont mis en suspension dans 50 cm³ d'eau distillée et nous déterminons l'activité des enzymes qu'ils contiennent avec des prises d'essai de 2 cm³ et 5 cm³ pour le β glycérophosphate M/10, à pH 5,2 et de 10 cm³ et 20 cm³ pour l'inositophosphate M/10 à pH 5,2. Durée d'hydrolyse 48 heures.

TABLEAU XI.

Activité monoestérasique et phytasique des précipités obtenus par relargage fractionné de la Poudre de Radis non germé.

Enzymes précipités entre les pourcentages suivants de saturation en sulfate d'Ammonium	Activité enzymatique			
	β Glycérophosphate M/10		Inositohexaphosphate M/10	
	2 cm ³ (1)	5 cm ³	10 cm ³ (1)	20 cm ³
0 à 33	0,436 (2)	0,872	0,1	0,1
33 à 50	0,436	0,872	0,1	0,1
50 à 66	0,872	1,09	traces	traces
66 à 100	3,0	4,6	0,45	0,45

(1) Suspension d'enzymes obtenue par dissolution du précipité dans 50 cm³ d'eau distillée.

(2) Résultats exprimés en mg. de Phosphore libérés sous forme d'acide orthophosphorique.

Discussion des résultats.

Nous constatons que cette suite de relargages au sulfate d'ammonium a conduit finalement à l'obtention d'un précipité très actif sur les deux substrats utilisés (le dernier précipité entre 66 et 100 p. 100 de saturation). Par contre, le précipité obtenu entre 0 et 33 p. 100 de saturation est peu actif, le précipité obtenu entre 33 et 50 p. 100 de saturation est également peu actif. Le précipité obtenu entre 50 et 66 p. 100 de saturation possède déjà une activité monoestérasique appréciable alors que l'activité phytasique demeure insignifiante. COURTOIS [12, 13] avait déjà observé avec le son de Blé et la Moutarde-Blanche que les premières fractions précipitées avaient une activité monoestérasique accrue par rapport à l'activité phytasique.

Nous observons que le relargage fractionné du Radis donne les mêmes résultats. Il convient toutefois de signaler que les fractions assez actives n'apparaissent qu'au delà de 50 p. 100 de saturation ; alors que dans le cas du son de Blé et de la Moutarde Blanche, on obtenait déjà des fractions nettement actives entre 33 et 50 p. 100 de saturation.

Fractionnement par le Sulfate d'Ammonium de la poudre d'enzymes obtenue par précipitation acétonique.

Nous avons également soumis à un relargage fractionné par le sulfate d'Ammonium une préparation déjà partiellement purifiée : enzyme extrait par l'eau puis précipité par l'acétone.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE.

C'est exactement le même que celui utilisé dans le relargage fractionné de la poudre de Radis non germé par le Sulfate d'ammonium.

Nous l'appliquons à la suspension aqueuse à 4 p. 100 de poudre d'enzymes de Radis extraite par l'eau et précipitée par l'acétone. Les précipités obtenus de 0 à 33 p. 100, de 33 à 50 p. 100, et de 50 à 66 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium sont recueillis, desséchés sous vide sulfurique jusqu'à poids constant, et pesés. Nous constatons que le précipité formé à 33 p. 100 de saturation est minime. Pour la détermination de

l'activité des précipités nous avons prélevé 0,20 g. du produit ou la totalité si le poids est inférieur à 0,20 g. ; nous le mettons en suspension dans 50 cm³ d'eau distillée toluénée. Après agitation mécanique, nous avons passé sur coton les fractions séparées par relargage, par contre, nous avons utilisé directement la suspension du résidu insoluble de la préparation diastatique initiale.

Nous déterminons l'activité des enzymes avec des prises d'essai de 2 cm³ et 6 cm³ pour le β glycérophosphate M/10 à pH 5,2 et de 6 cm³ et 18 cm³ pour l'inositophosphate M/10 à pH 5,2. Hydrolyse de 48 heures à 37°.

TABLEAU XII.

Fractionnement au sulfate d'Ammonium de la poudre d'enzymes de Radis précipitée à l'Acétone.

Enzymes précipités entre les pourcentages suivants de saturation en sulfate d'Ammonium	Poids du précipité en g.	Activité Enzymatique			
		β glycérophosphate		Inositophosphate	
		2 cm ³ (1)	6 cm ³	6 cm ³	18 cm ³
(2)	0,286	traces	0,5	traces	traces
0 à 33	0,144	0,3 (3)	0,6	0	traces
33 à 50	0,540	1,85	3,8	0	0,25
50 à 66	1,354	1,50	3,2	0	0,25

(1) Suspension d'enzymes après relargage fractionné.
 (2) Résidu insoluble de la préparation initiale après centrifugation.
 (3) Les chiffres du tableau représentent le nombre de milligr. de P libérés dans nos conditions opératoires habituelles.

DISCUSSION DES RÉSULTATS.

Nous voyons que le culot de la première centrifugation est presque sans aucune activité, ce que nous prévoyons d'ailleurs puisqu'il est constitué de protéines dénaturées insolubles dans l'eau.

Le produit obtenu entre 0 et 33 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium ne manifeste qu'une faible activité glycérophosphatase mais pas d'activité phytase.

Là aussi nous avons obtenu une préparation active sur le β glycérophosphate et inactive sur l'inositophosphate.

Entre 33 et 50 p. 100 de saturation, l'activité phosphatase est plus élevée alors que l'activité phytase demeure minime quoique non négligeable.

Le produit obtenu entre 50 et 66 p. 100 de saturation a une activité très proche du précédent ; et nous pouvons faire les mêmes commentaires. Ces deux derniers précipités ont été utilisés par la suite afin de tenter d'obtenir une activité plus marquée pouvant seule rendre compte du comportement de la phytase par rapport à la phosphatase.

**Modification introduite dans l'étude des précipités obtenus
entre 33 et 50 p. 100 et 50 et 66 p. 100
en saturation de sulfate d'Ammonium.**

Nous avons tenté de préciser si la séparation de la monoestérase et de la phytase observée précédemment avec un taux normal d'enzymes, s'observerait à nouveau en utilisant de plus fortes proportions de suspension d'enzymes pour une même quantité de substrat et une durée d'hydrolyse plus longue. Nous faisons un premier essai avec la suspension d'enzymes à 1 p. 100 du précipité obtenu entre 33 et 50 p. 100 de saturation en sulfate d'Ammonium. Nous faisons réagir 15 cm³ de la suspension durant 10 jours à 37° sur 5 cm³ d'inositophosphate M/10 à pH 5,2 dans les conditions opératoires habituelles.

Nous observons dans ces conditions, que l'inositophosphate a libéré 0,55 mg. de Phosphore.

En recommençant un nouvel essai, avec 30 cm³ de suspension enzymatique et une hydrolyse de 10 jours, nous constatons que l'inositophosphate a libéré dans ces conditions 1,3 mg. de Phosphore.

Ces résultats montrent nettement que l'absence d'activité phytasique observée dans le précipité entre 33 et 50 p. 100 en sulfate d'Ammonium, n'était qu'apparente puisque avec une quantité plus importante d'enzyme et une durée d'hydrolyse plus longue le précipité obtenu entre 33 et 50 p. 100 de saturation en sulfate d'Ammonium manifestait une activité phytasique notable.

En utilisant exactement les mêmes modifications précédentes, nous observons pour le précipité obtenu entre 50 et 66 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium les mêmes faits. L'inositophosphate dans ce cas a libéré pour 15 cm³ de suspension d'enzymes 0,45 mg. de phosphore et pour 30 cm³ il a libéré 1,3 mg. de phosphore dans les conditions opératoires habituelles. Les mêmes déductions que précédemment s'appliquent dans ce cas.

Conclusions. — Les essais de relargage nous ont conduits à des préparations sans activité phytasique importante. Par contre, certaines possèdent des activités monoestérasiques appréciables. Le relargage fractionné au sulfate d'ammonium ne permet donc pas d'envisager la possibilité d'obtenir des préparations où l'activité phytasique ne serait pas associée à l'activité monoestérasique.

NOUVEL ESSAI DE RELARGAGE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM.

Nous avons pensé que la série de relargages successifs pouvait avoir inactivé les enzymes au cours des opérations, c'est pourquoi après avoir éliminé la fraction précipitée entre 0 et 33 p. 100 de saturation, nous avons séparé de suite la fraction précipitant entre 33 et 66 p. 100. Au lieu d'ajouter $\frac{V \text{ cm}^3}{3}$ de solution de sulfate d'ammonium à saturation puis $\frac{V \text{ cm}^3}{2}$, nous ajoutons deux volumes de solution saturée de sulfate d'ammonium.

Le précipité obtenu après centrifugation et dessiccation sous vide sulfurique est recueilli ; nous mesurons son activité dans les conditions habituelles, en utilisant 2 cm³ et 6 cm³ de suspension d'enzymes pour le β glycérophosphate et 6 cm³ et 18 cm³ pour l'inositohexaphosphate.

Dans ces conditions, le β glycérophosphate a libéré 2,4 mg. de phosphore pour les 2 cm³ de suspension et 4,9 mg. pour les 6 cm³ de suspension d'enzymes. L'inositohexaphosphate n'a pas été hydrolysé de façon manifeste au cours d'essais similaires.

Il s'avère donc à la suite de ce relargage rapide que l'activité phosphomonoestérasique s'est sensiblement améliorée, mais l'activité phytasique n'a pas subi d'amélioration notable.

Conclusions des essais de fractionnement au sulfate d'Ammonium. — Les essais de fractionnement par le sulfate d'Ammonium n'ont pas permis d'obtenir une préparation agissant uniquement sur l'inositohexaphosphate ; par contre, les premières fractions précipitées ont une activité phosphomonoestérasique appréciable tandis que l'activité phytasique est des plus minimes.

Tout se passe donc comme si les graines de Radis conte-

naient une phosphatase banale inactive sur l'inositohexaphosphate et précipitant la première. Cette monoestérase serait associée à une phytophosphatase active sur les deux substrats et précipitant pour une plus forte salinité du milieu que la phosphomonoestérase.

Les faits observés avec le Radis concordent avec ceux précédemment indiqués par COURTOIS [12, 13] pour le Son de Blé et la Moutarde Blanche.

3) Fractionnement au Méthylal de la poudre d'enzymes précipitée par l'acétone.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE.

Nous utilisons la poudre d'enzymes de Radis précipitée par l'acétone dont nous avons donné la préparation à la page 65. 5 grammes de cette poudre sont mis en suspension dans 100 cm³ d'eau distillée selon le processus habituel. Nous centrifugeons puis refroidissons le liquide surnageant à la glacière.

Nous ajoutons alors 15 p. 100 du volume de méthylal refroidi à 0°. Nous centrifugeons après contact d'une demi-heure à 0°.

Le précipité collecté est lavé en le mettant en suspension dans de l'acétone. Après une nouvelle centrifugation, nous laissons égoutter le tube.

Nous desséchons dans le vide sulfurique et recueillons le faible précipité pour le pulvériser très finement et mesurer son activité dans les conditions habituelles.

TABEAU XIII.

Activités monoestérasique et phytasique des fractions obtenues par précipitation au Méthylal.

Substrats	β Glycérophosphate M/10		Inosito-hexaphosphate M/10
Suspension d'enzymes	2 cm ³	5 cm ³	5 cm ³
1 ^{re} fraction 15 p. 100..	1,3 (1)		0,8
2 ^e fraction 66 p. 100..		5,5	2,8
3 ^e fraction acétone...		6,25	4,4
(1) En mg. de P.			

Le liquide surnageant refroidi à 0° est additionné de un demi volume de méthylal refroidi et nous obtenons un précipité que nous laissons déposer durant une demi-heure à 0°.

Après centrifugation et lavage à l'acétone nous desséchons le précipité obtenu dans le vide sulfurique et déterminons son activité.

Le liquide qui surnageait le précipité précédent est additionné d'un volume égal d'acétone refroidie, il apparaît ainsi un nouveau précipité d'apparence gélatineuse que nous lavons à l'acétone et desséchons sous vide.

Discussion des résultats.

Le fractionnement au méthylal tout comme le fractionnement au sulfate d'ammonium fournit au début des précipités où l'activité monoestérasique est accrue par rapport à l'activité phytasique. Tout se passe là encore comme si nous nous trouvions en présence d'un mélange de phosphomonoestérase et de phytosphatase. La phosphomonoestérase précipitant la première.

Le précipité obtenu par le mélange méthylal/acétone donne un produit assez actif sur les deux substrats. Nous l'utiliserons pour des adsorptions ultérieures.

Expériences d'adsorption et de désorption sur la poudre d'enzymes de Radis non germé précipitée par l'acétone et le méthylal.

Nous avons soumis les précipités actifs obtenus en fractionnant par le méthylal et par l'acétone (p. 72) à des essais d'adsorption et de désorption.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE.

Nous pesons 0,50 g. de produit desséché sous vide sulfurique et nous le mettons en suspension dans 10 cm³ de tampon acétate de sodium-acide acétique M/1 de pH 5,2. Nous complétons à 60 cm³ avec de l'eau distillée toluénée et agitons mécaniquement durant 30 minutes ; nous filtrons alors sur papier.

Nous prélevons 15 cm³ du filtrat obtenu afin d'effectuer le dosage des activités monoestérasique et phytasique. Les me-

sures des activités trouvées sont exposées avec celles des expériences suivantes dans le tableau XIV.

TABLEAU XIV.

Activités monoestérasique et phytasique des préparations d'enzymes de Radis précipités au Méthylal et à l'Acétone, après adsorption et élution.

Origine de l'enzyme	Enzyme étudié	Ténor (Activité des enzymes avant adsorption)	Pourcentage d'activité retenue par l'adsorbant				Elution Solution ammoniacale
			Terre d'infusoires a	Kaolin b	Alumine C γ c	Kaolin après alumine (4) d	
1 ^{re} fraction précipitée entre 15 et 66 p. 100 de méthylal obtenue page 72	Monoestérase	8,2	0 (2)	2	76	0	1 (1)
	Phytase	0,7	22 (2)	22	93 a 100(3)	0	traces
2 ^e fraction précipitée par le mélange méthylal-acétone obtenue page 72	Monoestérase	5,7	0	19	83	0	0,95
	Phytase	1,3	26	26	88	0	traces

(1) Nombre de millig. de Phosphore libérés à partir des substrats respectifs.
 (2) Les chiffres du tableau représentent les pourcentages d'activité retenue par l'adsorbant.
 (3) L'adsorption paraît totale car les résultats trouvés se confondent pratiquement avec ceux obtenus sans substrats.
 (4) Pourcentage de l'activité, persistant après action de l'alumine, puis retenue ensuite par le Kaolin.

Adsorption sur terre d'infusoires.

Nous prélevons 13 cm³ de la solution d'enzyme à 0,83 g. p. 100 et nous les agitions pendant une heure avec 0,10 g. de terre d'infusoires. Puis nous centrifugeons et mesurons l'activité du liquide surnageant en le faisant agir dans les conditions habituelles sur le β glycérophosphate et sur l'inositohexaphosphate.

Nous constatons (essai a, tableau XIV) que la monoestérase des deux fractions n'a pas été adsorbée, par contre la phytase l'a été faiblement.

Nous pouvons remarquer que l'adsorption de la phytase est

un peu plus marquée dans la fraction précipitée à l'acétone que dans la fraction précipitée par le Méthylal.

Adsorption sur Kaolin.

Nous prélevons 13 cm³ de la solution d'enzymes à 0,83 p. 100 et les agitons durant une heure avec 0,10 g. de Kaolin. Nous centrifugeons et mesurons l'activité comme précédemment sur 5 cm³ de la solution ainsi traitée. Nous voyons (essai b, tableau XIV) que l'activité phytasique a été faiblement adsorbée comme dans le cas de la terre d'infusoires. La glycérophosphatase de l'enzyme fractionné par le méthylal n'est pratiquement pas adsorbée.

L'adsorption quoique minime, est plus accentuée avec l'enzyme précipité par l'acétone.

Adsorption par l'Alumine C γ .

Nous agitons dans les mêmes conditions que précédemment 13 cm³ de solution d'enzyme à 0,83 p. 100 avec 13 cm³ de suspension d'Alumine C γ et centrifugeons pour mesurer l'activité enzymatique sur une prise d'essai double de celles utilisées précédemment, puisque les opérations ont dilué de moitié les volumes en jeu. Nous observons (essai c, Tableau XIV) que l'Alumine C γ agissant sur la première fraction retient la presque totalité de l'activité phytasique et seulement 76 p. 100 de l'activité monoestérasique. La phytase de la seconde fraction est moins facilement adsorbée que celle de la première fraction. Par contre la phosphomonoestérase est légèrement plus adsorbable que pour la fraction précitée au méthylal.

L'action de l'Alumine C γ nous a permis d'obtenir à partir de la première fraction une préparation possédant une activité appréciable sur le β glycérophosphate mais dépourvue pratiquement d'activité phytasique.

Nous avons tenté de fixer sur le Kaolin la fraction des enzymes qui n'aurait pas été retenue par l'Alumine C γ . Cette recherche (essai d, Tableau XIV) s'est révélée infructueuse et le Kaolin une fois de plus s'est montré d'une efficacité bien faible.

Elution par une solution ammoniacale.

Dans un autre essai nous avons tenté d'éluer par une solution alcaline diluée les enzymes adsorbés sur l'alumine C γ et collectés par centrifugation (essai c). L'agent d'élution est une solution de 5 g. de chlorure d'ammonium et 2 cm³ d'ammoniaque à 20 p. 100 dans 250 cm³ d'eau.

Nous agitions mécaniquement pendant une heure le précipité d'alumine C γ avec 20 cm³ de la solution ammoniacale, puis laissons en contact durant 6 heures à la glacière. Nous neutralisons alors jusqu'à pH 5,2 avec de l'acide acétique 2 N en présence de rouge de méthyle et complétons à 50 cm³ avec de l'eau distillée. Nous déterminons les activités monoestérasique et phytasique en prélevant 10 cm³ de solution pour le glycérophosphate et 20 cm³ pour l'inositophosphate (10 cm³ pour un témoin sans substrat). Nous constatons (essai e, tableau XIV) que l'agent éluant paraît n'avoir élué qu'une faible partie de l'activité glycérophosphatasique mais pratiquement pas de l'activité phytasique.

Nous obtenons une fois de plus une préparation active sur le glycérophosphate et pratiquement dépourvue de toute action sur l'Inositohephosphate.

Discussion des résultats.

Cette série d'essais nous montre que la terre d'infusoires et le Kaolin ont été des agents d'adsorption médiocres ; ils fixent cependant d'une façon plus accentuée, la phytase que la phosphomonoestérase. L'Alumine C γ adsorbe également d'une façon appréciable les deux enzymes. L'adsorption est encore plus importante pour la phytase que pour la glycérophosphatase. Cette constatation est en relation avec la règle générale que lorsque deux substances adsorbables d'une façon voisine se trouvent en contact avec le même adsorbant, la substance possédant la plus faible concentration dans le milieu est celle dont le pourcentage d'adsorption est le plus élevé.

Tout se passe donc comme si la phytase, qui se trouve en plus faible proportion que la monoestérase dans le milieu (comme l'indiquent les rapports de leurs activités respectives), était retenue en plus forte proportion par l'adsorbant.

A partir de la première fraction précipitée par le méthylal il est d'ailleurs possible d'obtenir après action de l'alumine un

liquide surnageant actif sur le glycérophosphate et pratiquement sans action sur l'inositohexaphosphate.

L'action désorbante d'une solution ammoniacale diluée permet d'obtenir à partir de l'alumine C_γ utilisée pour l'adsorption une préparation qui hydrolyse là encore le glycérophosphate sans avoir d'action appréciable sur l'inositohexaphosphate.

Conclusions de ce Chapitre. — Les essais de fractionnement par relargage au sulfate d'ammonium ou précipitation par le méthylal et l'acétone ont fourni des précipités d'activités variables. Tout se passe comme si les graines de Radis renfermaient au moins deux fractions phosphatasiques.

1. Une monoestérase active sur le glycérophosphate et inactive sur l'inositohexaphosphate, cette fraction précipite la première lors de l'addition progressive de sulfate d'ammonium ou de solvant organique.

2. Une phytosphatase active sur les deux substrats et précipitant pour une plus forte salinité ou une concentration plus élevée en solvant organique.

Les essais d'adsorption réalisés sur deux de ces préparations purifiées, conduisent aux mêmes conclusions, la phytosphatase étant plus facilement retenue par les adsorbants que la monoestérase.

Nous avons pu obtenir des échantillons actifs sur le glycérophosphate et dépourvus d'action sur l'inositophosphate ; par contre, nous n'avons jamais obtenu de phytase dépourvus d'action sur le glycérophosphate.

CHAPITRE II.

1) Action de divers effecteurs sur les phosphatases de Radis non germé.

Nous avons cherché à différencier la phytosphatase de la phosphomonoestérase en soumettant ces enzymes à l'action des effecteurs.

Comme effecteur physique, nous avons eu recours à la chaleur et nous avons tenté de séparer les deux enzymes par inactivation thermique sélective du plus thermolabile des deux.

Comme effecteurs chimiques nous nous sommes adressés à un certain nombre de corps activateurs ou inhibiteurs des phosphatases en général ou de certaines phosphatases spécifiques en particulier.

Essai de séparation des deux enzymes par inactivation thermique.

C'est une des plus élégantes méthodes de séparation des enzymes, en pratique elle est assez rarement applicable par suite des faibles écarts entre les températures mortelles des enzymes que l'on désire séparer. Nous avons donc porté pendant un certain temps notre préparation à diverses températures de façon à rechercher s'il était possible de trouver les conditions opératoires permettant d'inactiver totalement l'un des deux enzymes tandis que l'autre enzyme associé conserve encore une activité appréciable.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE.

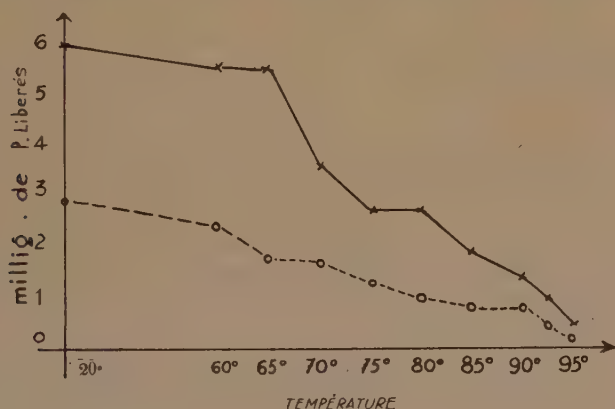
Nous réalisons une suspension à 1 p. 100 de poudre diastase, obtenue par extraction aqueuse et précipitation acétonique (p. 65) dans de l'eau distillée toluénée.

Nous agitons mécaniquement durant 30 minutes, passons sur coton et centrifugeons.

Nous avons pratiqué cet essai dans un becher de 2 litres, rempli d'eau, dans lequel plonge un grand tube à essai en verre

Pyrex, d'une contenance de 100 cm³ ; nous y mesurons 20 cm³ de la macération d'enzymes. Dans un autre tube, identique, et plongeant également dans le b  cher rempli d'eau nous disposons un thermomètre et 20 cm³ d'eau distillée.

Pour chaque cas, nous maintenons durant exactement cinq minutes à température constante en surveillant l'intensité de la flamme chauffant le b  cher et en agitant continuellement les tubes. L'essai terminé, le tube à réaction est ensuite refroidi-



Courbe d'inactivation thermique du Radis non germé.

Abscisses : Température de l'essai.

Ordonnées : Milligrammes de P libérés.

— Traits pleins : Activité phosphomonoestérasique.

--- Traits pointillés : Activité phytasique.

TABLEAU XV.

Inactivation thermique de la poudre d'enzymes de Radis précipités par l'acétone.

Température de l'essai		20��	60��	65��	70��	75��	80��	85��	90��	92��5	95��
Activité relative (1)	Monoestérase	100 (2)	93	93	60	45	45	32	23	8	8
	Phytase	100 (2)	75	61	51	43	34	29	26	13	6,5

(1) L'activité relative est exprimée par le rapport : milligrammes de P libérés par la préparation portée à la température étudiée sur milligrammes de P libérés par la même préparation non chauffée. Ce rapport étant multiplié par 100.

(2) 5 cm³ de préparation non chauffée libèrent 6 milligrammes de P à partir du    gly  rophosphate et 13 cm³ 2,9 milligrammes de P à partir de l'inositophosphate.

di immédiatement sous un courant d'eau froide. Nous pratiquons alors les essais habituels de mesure d'activité à pH 5,2 avec 5 cm³ de solution d'enzymes à 1 p. 100 pour 5 cm³ de substrat au β glycérophosphate et avec 13 cm³ de suspension pour 5 cm³ de substrat inositohexaphosphorique en présence de 10 cm³ de tampon acéto-acétique de pH 5,2. L'hydrolyse est effectuée à 37° durant 48 heures.

Les différents résultats obtenus sont groupés dans le tableau XV.

La courbe jointe représente les comportements des 2 enzymes sous l'effet de la chaleur.

Discussion des résultats.

Le fait caractéristique de la courbe est qu'elle est asymptotique à l'axe des abscisses. L'activité des deux enzymes ne s'annule pas intégralement aux températures voisines de 100°, pour un contact de cinq minutes seulement.

Ce fait surprenant sera retrouvé lors de l'étude de l'inactivité des enzymes du radis germé.

Peut-être la présence des protéines plus difficilement dénaturées par la chaleur protège-t-elle la fraction d'enzymes non détruite.

A côté de l'allure exponentielle de la courbe obtenue, il ressort que la température critique où les enzymes commencent à subir une inactivation est au voisinage de 60°.

Nous retrouverons cette température d'inactivation initiale dans l'étude du radis germé.

Il faut remarquer que la phytase est plus sensible que la phosphatase à la chaleur : à 65° la phosphatase conserve sensiblement son activité primitive alors que la phytase a perdu presque la moitié de son activité. Cet écart s'amenuise lorsque la température croît.

Nous constaterons dans la courbe de l'inactivation des enzymes du radis germé, un étalement moins prononcé. Peut-être là aussi sommes-nous en présence de protéines protectrices qui n'existeraient pas dans le radis germé ou si elles existent, le seraient en bien moindre quantité.

Conclusion. — L'inactivation thermique n'a pas permis de séparer les deux activités diastasiques associées. Tout au plus permet-elle de noter une thermolabilité un peu supérieure de la phytase.

2) Action de différents composés chimiques sur la poudre d'enzymes de Radis précipitée par l'Acétone.

Nous nous sommes adressés aux effecteurs suivants possédant une action caractéristique sur les phosphatases du type II.

1° Le fluorure de sodium, inhibiteur énergique de toutes les phosphatases étudiées de ce type [10, 21, 64].

2° Le sulfate de sodium, étudié dans le but de connaître l'action de l'anion SO_4^- associé à d'autres éléments métalliques.

3° Le sulfocyanate d'ammonium qui active d'une façon modérée une partie des phosphatases II étudiées. COURTOIS et BOSSARD [6, 16].

4° Le cyanure de potassium qui inhibe certaines phosphatases alcalines en formant des complexes avec les ions métalliques appartenant à ces enzymes, NAGANNA et NARAYANA MENON [52, 64].

5° L'oxalate de sodium dont l'action inhibitrice est moins intense et moins régulière sur les phosphatases II. NGUYEN VAN THOAI [53], RAPOPORT-LEVA et GUEST [61], ROCHE et COURTOIS [64].

Dans le cas de l'oxalate nous avons recherché si l'action était due à l'anion oxalique ; c'est pourquoi nous avons opéré avec deux oxalates alcalins ; oxalates de Sodium et d'Ammonium.

6° Le Chlorure de Calcium pour rechercher si le calcium a une action activatrice, car il était possible d'envisager que l'inhibition provoquée par l'oxalate était due à une précipitation d'ions Ca^{++} indispensables à l'activité de l'enzyme.

7° Le Sulfate de Magnésium qui active les phosphatases du type I, inhibe assez fortement celles du type III mais demeure sans action ou inhibe légèrement les phosphatases II. COURTOIS [10, 13, 14], NGUYEN VAN THOAI [53, 54, 55], ROCHE et COURTOIS [64].

8° Le sulfate de Zinc que PLUMEL [59] a trouvé avoir une forte action inhibitrice sur la phosphatase II urinaire.

TABLEAU XVI.

Activités monoestérasiqne et phytasique de la suspension d'enzymes de Radis à 1 p. 100 obtenue par précipitation acétonique, en présence de divers effecteurs.

Concentration moléculaire de l'effecteur dans le milieu réactionnel		2.10 ⁻⁴	4.10 ⁻⁴	1.10 ⁻³	2.10 ⁻³	4.10 ⁻³	1.10 ⁻²	2.10 ⁻²	3.10 ⁻²	4.10 ⁻²
<i>Nature de l'effecteur :</i>		Activité relative (1)								
Fluorure de Sodium	Monoestérase..	100				26	47	8		
	Phytase	98				64	50	35		
Sulfate de Sodium	Monoestérase..				98		91			84
	Phytase				90		86			28
Sulfocyanate d'Ammonium	Monoestérase..				128		128			133
	Phytase				100		100			100
Cyanure de Potassium	Monoestérase..				96		95	77		
	Phytase				90		78	62	68	
Oxalate de Sodium	Monoestérase..				98		86	85		74
	Phytase				100		55	37		15
Oxalate d'Ammonium	Monoestérase..				129	129	109	109		
	Phytase				69	45	40	11		
Chlorure de Calcium	Monoestérase..		98	88	88	88				
	Phytase		100	100	100	100				
Sulfate de Magnésium	Monoestérase..		100	106	107	107				
	Phytase		98	98	98	98				
Sulfate de Zinc	Monoestérase..		75	64	51	40				
	Phytase		80	72	62	50				

(1) L'activité relative est exprimée par le rapport : milligrammes de P libérés, par la préparation avec l'effecteur sur milligrammes de P libérés par la même préparation sans effecteur. Ce rapport étant multiplié par 100. 5 cm³ de préparation sans effecteur libèrent 16,5 mg. de P à partir du β glycérphosphate et 10 cm³ 13,25 mg. de P à partir de l'inositophosphate.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE.

Nous procédons alors à nos essais dans les conditions habituelles en additionnant le milieu de concentrations variables d'effecteur.

Nos résultats sont rassemblés dans le tableau XVI.

a) *Action du fluorure de Sodium.*

A une concentration très faible de 2.10^{-4} M ce sel s'est révélé sans action inhibitrice appréciable, par contre, à partir d'une concentration 4.10^{-3} M, il exerce une inhibition qui s'accroît avec la concentration en fluorure.

Cette inhibition est nettement plus marquée pour la monoestérase que pour la phytase comme l'avait déjà observé J. COURTOIS [13, 14] avec l'enzyme de la Moutarde blanche.

b) *Action du Sulfate de Sodium.*

Ce sel n'exerce à forte concentration qu'une inhibition peu marquée sur la monoestérase. L'action inhibitrice est par contre beaucoup plus intense sur la phytase.

c) *Action du Sulfocyanate d'Ammonium.*

Le sel provoque une activation de la monoestérase qui paraît être assez indépendante de la concentration en effecteur dans les limites étudiées. COURTOIS et BOSSARD [16] avaient d'ailleurs observé des faits semblables avec d'autres phosphatases végétales. Par contre l'activité de la phytase n'apparaît pas être modifiée en présence de sulfocyanate d'Ammonium. FLEURY et COURTOIS [27], COURTOIS [13] ont obtenu des résultats identiques avec le Son de Blé et la Moutarde blanche.

d) *Action du cyanure de Potassium.*

Il exerce une action inhibitrice peu marquée sur les deux enzymes ; avec d'autres enzymes métalloprotéiques dont le coenzyme renferme du fer ou du cuivre, comme les oxydases, catalases, peroxydases, l'action inhibitrice du cyanure de potassium est considérable pour de faibles concentrations en cet effecteur.

Nous pouvons remarquer dans nos essais que la phytase est nettement plus sensible à l'action du cyanure que la monoestérase.

e) *Action des oxalates.*

Les deux oxalates alcalins se comportent d'une façon différente sur la monoestérase.

Tandis que l'oxalate d'ammonium exerce une légère activation qui peut se rapprocher de celle du sulfocyanate d'Ammonium, c'est-à-dire une influence de la salinité du milieu, l'oxalate de sodium inhibe faiblement cette monoestérase. Par contre, les deux oxalates inhibent la phytase d'une façon très nette ; à des concentrations équimoléculaires l'oxalate d'ammonium possède l'effet le plus marqué.

f) *Action du Chlorure de Calcium.*

Il était possible d'envisager que l'action inhibitrice des oxalates sur la phytase provenait de la précipitation d'un élément métallique. Nos essais avec le chlorure de calcium ne nous ont pas fourni de renseignements à ce sujet, car ce sel n'exerce pratiquement aucune action sur la phytase. Il a par contre inhibé faiblement la monoestérase. J. COURTOIS et M^{me} MANOUVRIER [19], NGUYEN VAN THOI [55] ont signalé le peu d'influence exercé par ce sel sur certaines phosphatases du type II.

Nous avons effectué des essais plus poussés dans ce domaine (Chapitre III, p. 86).

g) *Action du Sulfate de Magnésium.*

Le sel a activé de façon insignifiante la monoestérase alors qu'il est pratiquement sans action sur la phytase. Divers auteurs, en particulier COURTOIS et M^{me} MANOUVRIER [9] n'ont pas observé d'action activatrice des ions magnésium sur les phosphatases végétales du type II.

Par ailleurs, COURTOIS [14] n'a pas décelé d'activation par les ions magnésium de la phosphatase de Moutarde blanche avec divers esters phosphoriques dont l'acide phytique.

h) *Action du Sulfate de Zinc.*

Le sulfate de Zinc inhibe la monoestérase et la phytase comme PLUMEL [59] l'avait déjà observé pour la phosphatase urinaire.

Nous pouvons constater que l'action inhibitrice sur la monoestérase est toujours un peu supérieure à celle observée sur la phytase.

Conclusions. — Nous nous proposons d'étudier de façon plus détaillée ces divers résultats lorsque nous discuterons les chiffres obtenus en soumettant aux mêmes effecteurs, les enzymes du Radis germé et du Seigle.

Mais pour le moment, nous pouvons remarquer qu'il existe de nettes différences entre les comportements des effecteurs sur l'hydrolyse du glycérophosphate et de l'inositohexaphosphate. Il n'a pas été possible de provoquer une inhibition totale de l'hydrolyse d'une de ces deux substances tandis que l'autre conservait une certaine activité. Il est cependant indiscutable que nos préparations renferment au moins deux systèmes phosphatasiques distincts inégalement sensibles à l'action des effecteurs.

CHAPITRE III.

Recherches en vue de préciser le mode d'action inhibitrice des oxalates sur les phosphatases du Radis non germé.

Nous avons observé au chapitre précédent que la phytase était nettement inhibée par les oxalates d'ammonium et de sodium.

Nous avons cherché à préciser le mécanisme de l'action inhibitrice de l'anion oxalique sur la phytase.

Deux hypothèses pouvaient être envisagées :

1. Combinaison dissociable de l'anion oxalique avec la partie protéique de l'enzyme. Cette combinaison étant dépourvue d'activité diastasique. Dans ces conditions, on pouvait espérer réactiver l'enzyme en éliminant l'anion oxalique par dialyse.

2. L'acide oxalique donne de nombreux sels métalliques insolubles ou peu solubles. L'anion oxalique pouvait intervenir en précipitant un élément métallique nécessaire à l'activité de l'enzyme. Dans ces conditions, après élimination par dialyse de l'acide oxalique agent précipitant, l'enzyme dialysé devrait être réactivé en ajoutant au milieu un sel du métal susceptible d'avoir été précipité. Nous avons donc réalisé des essais en vue de chercher s'il était possible de vérifier l'une ou l'autre de ces hypothèses.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE.

Nous préparons une suspension à 2 p. 100 d'enzymes de radis, dans l'eau toluénée, nous filtrons après agitation mécanique et prélevons 7,50 cm³ pour les placer dans un dialyseur à membrane de cellophane contenant 10 cm³ de solution d'oxalate d'Ammonium M/5 amené à pH 5,2 par de l'acide acétique 2N. Nous effectuons un essai témoin en vue de préciser l'influence qui pouvait être inactivante, d'une longue dialyse sur l'enzyme en l'absence d'effecteur. C'est pourquoi dans un second dialyseur nous introduisons le mélange de 7,5 cm³ de la

Il s'avère donc que l'élimination de l'oxalate par dialyse n'a pas réactivé l'enzyme.

Par ailleurs, nous avons soumis à l'action de différents effecteurs la préparation d'enzyme additionnée d'oxalate puis dialysée. Nous avons opéré des essais similaires à ceux du Chapitre II. Nos résultats sont réunis dans le Tableau XVII.

1. Le Fluorure de Sodium inhibe les deux enzymes. Cette inhibition est plus marquée qu'au Tableau XVI comme si l'enzyme traité par l'oxalate et dialysé était plus facilement inactivé.

Nous pouvons remarquer une fois de plus que la monoestérase est plus sensible à l'inhibition flubrée que la phytase.

2. L'oxalate d'ammonium demeure pratiquement sans action sur la monoestérase. Par contre, il inhibe encore très nettement la phytase. Cette inhibition est cependant moins marquée qu'avant traitement par l'oxalate et dialyse.

Il paraît plus logique de concevoir que l'oxalate forme avec l'enzyme une combinaison de faible activité. La moindre sensibilité à l'oxalate de l'enzyme traité par cet effecteur puis dialysé ne doit cependant pas faire exclure l'hypothèse d'une précipitation par l'oxalate d'un élément métallique favorable à l'action de la phytase.

Nous ne considérons pas cependant ces résultats comme assez significatifs pour envisager que l'oxalate a précipité un ion métallique absolument indispensable à l'enzyme.

L'oxalate ne paraît pas avoir agi en précipitant l'ion calcium. En effet l'enzyme traité par cet effecteur puis dialysé n'est pas réactivé par le chlorure de calcium. La même remarque peut être formulée quoique d'une façon moins significative pour l'ion magnésium.

L'enzyme traité par l'effecteur et dialysé est inhibée par les sels de zinc d'une façon plus marquée que l'enzyme non dialysé.

Il apparaît ainsi en premier lieu que l'anion oxalique n'a pas précipité de zinc nécessaire à l'activité de l'enzyme.

En second lieu les sensibilités plus grandes de l'enzyme dialysé aux deux effecteurs que sont les fluorures et le sulfate de zinc nous paraissent pouvoir être rapprochées.

Comme l'ont noté de nombreux auteurs, ROCHE, NGUYEN VAN THOI en particulier, les enzymes sont d'autant plus sensibles aux effecteurs spécifiques qu'ils sont davantage purifiés. L'action précipitante de l'oxalate puis la dialyse ultérieure ont pu

précisément éliminer des impuretés retardant l'action inhibitrice des fluorures et des sels de zinc dans la préparation non purifiée.

Conclusions. — Nous terminerons en remarquant que tout comme la préparation non dialysée les effecteurs influent de façon quantitativement différente sur les hydrolyses du glycérophosphate et de l'inositohexaphosphate.

Ces faits viennent à l'appui de notre hypothèse de l'existence de deux systèmes phosphatasiques distincts dans le Radis.

CHAPITRE IV.

Essais de purification et de fractionnement des phosphatases du Radis soumis à la germination.

Nous avons indiqué chapitre II, 2^e partie que la germination du Radis s'accompagnait d'un accroissement considérable de son activité phytasique. Il nous a paru intéressant de comparer les enzymes du Radis germé à ceux de la graine en repos.

De ce fait, nos essais avec la graine germée sont analogues à ceux que nous avons réalisé avec le Radis non germé au chapitre I de la 3^e partie.

a) PRÉCIPITATION ACÉTONIQUE.

Nous utilisons des graines de Radis soumises à une germination pendant 7 jours selon les conditions opératoires du chapitre II, p. 50, nous appliquons exactement les mêmes procédés utilisés lors de la préparation des enzymes des graines non germées, extraction aqueuse et précipitation acétonique (Chapitre I, page 65). Nous constatons que 5 cm³ de la suspension à 1 p. 100 des enzymes de Radis germé obtenus par précipitation acétonique réagissant sur le β glycérophosphate M/10 dans les conditions habituelles libèrent 12,5 mg. de Phosphore, cependant que 10 cm³ agissant sur l'inositophosphate libèrent 9,8 mg. de Phosphore (Durée d'hydrolyse 48 heures).

L'extraction aqueuse et la précipitation acétonique nous fournissent donc comme il était à prévoir une préparation plus active à partir des graines germées qu'à partir des mêmes graines au repos.

En effet la préparation d'enzymes de Radis germé précipités par l'acétone a une activité monoestérasique double de celle préparée dans les mêmes conditions avec les graines non germées. L'activité phytasique de la préparation de Radis germé précipitée par l'acétone est presque 4 fois plus élevée que celle d'une préparation obtenue d'une façon similaire à partir du Radis non germé.

**Fractionnement par le Sulfate d'Ammonium
de la poudre d'enzymes de Radis germé
obtenue par précipitation acétonique.**

Nous avons soumis à un relargage fractionné par le sulfate d'ammonium une préparation déjà active et partiellement purifiée ; l'enzyme des graines germées, extrait par l'eau puis précipité par l'acétone.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE.

1,50 g. de poudre d'enzymes de Radis germé, extraite par l'eau et précipitée par l'acétone, sont mis en suspension dans 50 cm³ de solution de sulfate d'ammonium à 5 p. 100 de saturation (1).

Nous poursuivons alors l'opération avec la même technique qui nous a servi lors de l'étude du fractionnement par le sulfate d'ammonium des enzymes des graines non germées (p. 68).

Nous recueillons les fractions insolubilisées entre 5 et 33 p. 100 de saturation puis de 33 à 50 p. 100 et enfin de 50 à 66 p. 100.

Les déterminations des activités sont exposées dans le Tableau XVIII.

TABLEAU XVIII.

Activités monoestérasiqne et phytasiqne des enzymes de Radis germé obtenus par précipitation acétonique puis relargués au sulfate d'ammonium.

Enzymes précipités entre les pourcentages suivants de saturation en sulfate d'ammonium	Substrats	
	β Glycérophosphate M/10 5 cm ³ suspension d'enzyme	Inositohexaphosphate M/10 10 cm ³ suspension d'enzyme
0 à 5 (1)	4,9	1,0
5 à 33	Pas de précipité	Pas de précipité
33 à 50	11,35	1,75
50 à 66	13,9	6,6
(1) Mélangée au résidu insoluble.		

(1) Nous avons observé que cette solution saline diluée dissout mieux l'enzyme, que l'eau distillée, l'enzyme renferme donc une fraction globulinique active.

Discussion des résultats.

Nous voyons nettement à la lecture de ce tableau que le précipité obtenu entre 50 et 66 p. 100 de saturation est très actif sur le β glycérophosphate et sur l'inositophosphate.

Nous constatons que la fraction qui ne s'est pas dissoute entre 0 et 5 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium est faiblement active en particulier vis-à-vis de l'inositohexaphosphate.

Nous n'avons pas obtenu de précipité entre 5 et 33 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium.

La fraction entre 33 et 50 p. 100 de saturation en sel présente une activité phosphomonoestérasique nette, mais une activité phytasique moins importante.

Nous pouvons observer que la fraction obtenue entre 50 et 66 p. 100 a une activité phytasique environ 4 fois supérieure à celle du précipité obtenu entre 33 et 50 p. 100. Par contre, l'activité phosphomonoestérasique du précipité de 50 à 66 est à peine supérieure à celle de celui apparu entre 33 et 50.

Nous observons une fois de plus que les fractions précipitées en premier lieu sont enrichies en monoestérase par rapport à la phytase.

Conclusions. — Lors de l'étude du Radis non germé les essais de fractionnement par le sulfate d'ammonium (page 68), nous ont conduit à des préparations sans activité phytasique importante mais douées pour certaines, d'activité monoestérasique appréciable.

Les essais similaires effectués sur le Radis germé montrent également une activité monoestérasique notable par rapport à l'activité phytasique.

Toutefois, le relargage permet d'obtenir des fractions phytasiques relativement actives à partir du Radis germé.

Ces faits confirment ceux déjà observés pour le Son de Blé et la Moutarde Blanche par COURTOIS [12, 13] et renforcent l'hypothèse de la phytophosphatase associée à une monoestérase banale. Cette phytophosphatase, active sur les deux substrats, précipite pour une plus forte salinité du milieu que la phosphomonoestérase.

Nous n'avons pas réussi néanmoins à séparer par ce procédé les deux activités enzymatiques.

**Expériences d'adsorptions et de désorption sur la préparation
de Radis germé précipitée par l'acétone et relarguée
par le Sulfate d'ammonium.**

Nous avons soumis à des essais d'adsorption et de désorption le précipité formé entre 50 et 66 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium et préparé dans le paragraphe précédent, p. 91.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE.

Nous opérons exactement de la même manière (p. 73) que pour les essais d'adsorption et d'élution sur la poudre d'enzymes de Radis non germé. Les prises d'essai et la durée d'hydrolyse sont identiques. Les mesures des activités trouvées sont rassemblées dans le Tableau XIX.

Adsorption sur terre d'infusoires.

Nous observons (essai a, Tableau XIX) que la monoestérase a été faiblement adsorbée tandis que la phytase l'a été notablement.

Adsorption par le Kaolin.

L'activité monoestérasique n'est fixée que d'une façon insignifiante alors que le même adsorbant a retenu les trois quarts de la phytase.

Adsorption par l'Alumine

Nous notons (essai c, Tableau XIX) que l'alumine retient au moins les 9/10^e de l'activité monoestérasique et la presque totalité de l'activité phytasique.

Nous avons une fois de plus obtenu une préparation dépourvue d'activité phytasique et possédant encore une certaine activité sur le β glycérophosphate.

La fraction diastasique qui n'avait pas été retenue par l'alumine C _{γ} n'a pu être fixée sur le Kaolin.

Elution par une solution ammoniacale.

Cet essai a été effectué selon le protocole opératoire précédemment décrit à la page 76.

La solution ammoniacale diluée n'a élué que des traces indosables d'enzymes (essai e, Tableau XIX).

TABLEAU XIX.

Activités monoestérasique et phytasique des préparations d'enzymes de Radis germé précipités par l'Acétone et relargués par le Sulfate d'ammonium.

Origine de l'enzyme	Activité diasta- sique étudiée	Témoïn Activité des enzymes avant adsorptions	Pourcentage d'activité retenue par adsorption				Elution par la solution ammoniacale
			Terre d'infusoires a	Kaolin b	Alumine γ c	Kaolin après alumine (3) d	
Fraction précipitée entre 50 et 66 p. 100 de saturation en sulfate d'am- monium obtenue page 91	Monoes- térase	5,8 (1)	24 (2)	6	92	0	traces (1)
	Phytase	1	55 (2)	75	98 à 100	0	traces

(1) Nombre de mg. de Phosphore libérés à partir des substrats respectifs.
 (2) Les chiffres du tableau représentent les pourcentages d'activité retenue par l'adsorbant.
 (3) Pourcentage de l'activité persistant après action de l'alumine, puis retenue par le Kaolin.

Discussion des résultats.

Cette série d'essais nous montre que la terre d'infusoires et le Kaolin ont manifesté un plus grand pouvoir adsorbant que dans les essais avec le Radis non germé (voir p. 76).

Tous les agents d'adsorption utilisés montrent un pouvoir de fixation plus marqué pour la phytase que pour la phosphomonoestérase.

Cette constatation peut s'expliquer aussi par la plus faible concentration en phytase dans le milieu, interprétation que nous avons déjà proposée dans l'étude du Radis non germé.

Conclusions. — Ces essais d'adsorption et d'élution ont permis d'obtenir des fractions actives sur le β glycérophosphate mais inactives sur l'inositohexaphosphate confirmant les résultats trouvés dans le cas des graines non germées.

Ces résultats fournissent de nouveaux exemples en faveur de l'hypothèse de l'existence d'une phytophosphatase distincte de la phosphomonoestérase banale.

CHAPITRE V.

Action de divers effecteurs physiques et chimiques sur les phosphatases du Radis germé.

Les résultats obtenus jusqu'à présent avec le Radis germé sont beaucoup plus caractéristiques et plus nets que ceux obtenus sur le Radis non germé. Dans un but de comparaison, nous avons cherché à nouveau à différencier la phosphomonoestérase de la phytase en soumettant ces enzymes à l'action des effecteurs déjà examinés pour les enzymes de Radis non germé.

Essai de séparation des deux enzymes par inactivation thermique.

Nous avons tenté de préciser l'inactivation thermique de la phytase et de la phosphatase. Le protocole utilisé est exactement le même que celui utilisé dans l'inactivation thermique du Radis non germé.

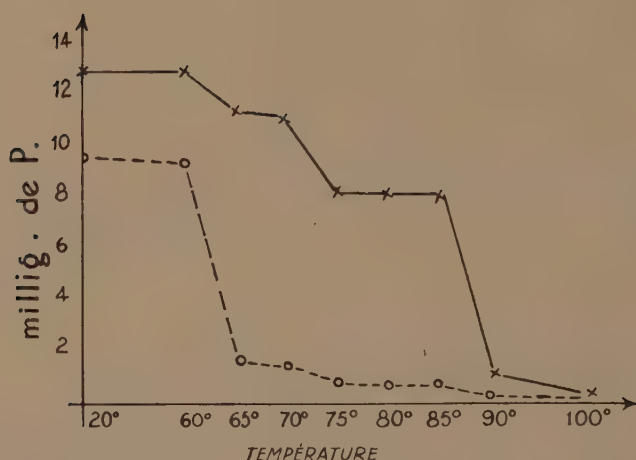
Nous avons réalisé une suspension aqueuse à 1 p. 100, filtrée sur coton, d'enzymes de Radis germé précipités par l'acétone et nous avons utilisé les mêmes prises d'essai que lors de l'étude du Radis non germé (chapitre II, p. 78).

TABLEAU XX.

*Inactivation thermique des enzymes de Radis germé
obtenus par précipitation acétonique.*

Température de l'essai		20°	60°	65°	70°	80°	85°	90°	100°
Activité relative (1)	Monoestérase..... 5 cm ³ suspension.	100 (2)	100	86	85	62	61	10	3
	Phytase..... 10 cm ³ suspension.	100 (2)	96	17	15	9	9	2	1

(1) L'activité relative est celle définie au tableau XV page 79
 (2) 5 cm³ de préparation non chauffée libèrent 13 mg. de Phosphore à partir du glycérophosphate et 10 cm³ 9,60 mg. de Phosphore à partir de l'inositohexaphosphate.



Courbe d'inactivation thermique des enzymes du Radis germé.

Abscisses : Température.

Ordonnées : Milligrammes de P libérés.

——— Traits pleins : Activité phosphomonoestérasiq.

----- Traits pointillés : Activité phytasiq.

Discussion des résultats.

Comme dans tous les essais antérieurs (Tableau XV, p. 79) la phytase est beaucoup plus thermolabile que la monoestérase associée. L'écart est particulièrement net à partir de 65°. En effet de 65° à 85° l'activité sur le β glycérophosphate n'est que faiblement diminuée alors qu'elle est devenue pratiquement insignifiante sur l'inositohexaphosphate.

Si nous comparons les enzymes du Radis germé à ceux du Radis non germé nous ne notons pas de différences très accentuées pour la phosphomonoestérase (chapitre II et chapitre V, courbe p. 79 et courbe p. 96) par contre nous observons des comportements très différents avec la phytase : la préparation de Radis germé apparaît être nettement plus thermolabile.

Nous avons indiqué chapitre II, p. 49 que la germination du Radis. avait considérablement accru son activité phytasique. Il paraît possible d'envisager que cette fraction phytasique apparue au cours de la germination (enzyme démasqué ou plus vraisemblablement néoformé), est particulièrement thermolabile.

Tout se passe comme si la phytase apparue au cours de la

germination était détruite entre 60° et 65°. Entre 65° et 90° les courbes obtenues avec la préparation de Radis non germé et la préparation de Radis germé sont similaires.

Il est vraisemblable qu'il s'agit d'une inactivation du même enzyme, celui qui préexiste dans les graines non germées et qui persiste dans les graines germées après destruction à 65° de la phytase formée au cours de la germination.

Il convient de remarquer que cette interprétation serait en contradiction avec certaines hypothèses de diffusion ou de dénaturation des enzymes préexistants dans la graine que nous avons proposé pour expliquer la chute d'activité après la macération des graines.

Conclusion. — L'inactivation thermique des enzymes du Radis germé n'a pas permis de séparer parfaitement les activités diastasiques étudiées. Toutefois à la température de 80° la phosphomonoestérase est encore très active tandis que la phytase est à peu près détruite.

**Action de différents composés chimiques
sur la poudre d'enzymes de Radis germé
précipitée par l'acétone.**

Nous nous sommes adressés aux effecteurs utilisés pour la graine non germée dans un but de comparaison et pour les motifs énumérés au chapitre II, p. 81.

PROTOCOLE OPÉRATOIRE.

Nous avons procédé à des déterminations identiques à celles réalisées avec la graine non germée (chapitre II, p. 83). Nos résultats sont rassemblés dans le Tableau XXI.

Le fluorure de sodium inhibe très nettement les deux enzymes, même à des concentrations très faibles. Cette inhibition était plus marquée avec l'enzyme traité par l'oxalate et dialysé (p. 88). Dans le cas actuel l'inhibition s'avère totale pour la phytase et une fois de plus nous obtenons une activité phosphomonoestérasique non associée à une activité sur l'inositohexaphosphate.

Il faut néanmoins remarquer que, contrairement à ce que nous avons trouvé pour le Radis non germé, et à ce qu'avait observé J. COURTOIS [13] avec l'enzyme de la Moutarde blan-

TABLEAU XXI.
*Activités monoestérasique et phytasique de la suspension
des enzymes de Radis germé en présence de divers effecteurs.*

Concentration moléculaire de l'effecteur dans le milieu réactionnel		2.10 ⁻⁴	2.10 ⁻³	4.10 ⁻³	1.10 ⁻²	2.10 ⁻²	3.10 ⁻²	4.10 ⁻²
Nature de l'effecteur	Activité relative (1)							
Fluorure de Sodium	Monoestérase...	62	69	45	36	12		
	Phytase	51	27	25	10	0		
Sulfocyanate d'Ammonium	Monoestérase...				81	81		81
	Phytase				50	40		37
Cyanure de Potassium	Monoestérase...		100		100	100	100	
	Phytase		100		81	81	76	
Oxalate d'Ammonium	Monoestérase...		100	100	100	100		
	Phytase		63	50	50	37		
Sulfate de Zinc	Monoestérase...			89	81	54		36
	Phytase			73	62	45		37

(1) L'activité relative est exprimée par le rapport : mg. de P libérés par la préparation avec l'effecteur sur mg. de P libérés par la même préparation sans effecteur. Ce rapport étant multiplié par 100, 5 cm³ de la préparation sans effecteur libèrent : 7,2 mg. de P à partir du β glycérophosphate et 10. cm³ 3,5 millig. de P à partir de l'inosito-phosphate.

che, l'inhibition est nettement plus accentuée avec la phytase qu'avec la monoestérase.

Le sulfocyanate d'ammonium provoque une légère inhibition de la monoestérase, indépendante de la concentration en effecteur dans les cas étudiés.

La phytase est assez notablement inactivée avec ce sel.

Ces résultats sont en opposition avec ceux trouvés dans les essais avec la graine non germée et ceux de COURTOIS [12, 13] avec la Moutarde blanche et le son de Blé.

Le cyanure de potassium exerce une action inhibitrice très faible sur les deux enzymes. Nous pouvons cependant signaler que la phytase est plus sensible à l'action du cyanure que la phosphomonoestérase.

L'oxalate d'ammonium inhibe très nettement la phytase mais n'a pratiquement pas d'action sur la monoestérase.

Le sulfate de zinc inhibe nettement les deux enzymes.

Conclusions. — L'effet de ces trois derniers effecteurs sur les enzymes étudiés est en accord avec ceux observés sur la graine de Radis non germée. Par contre l'action inhibitrice du fluorure de sodium sur les enzymes de la graine germée n'est pas parallèle à celle observée sur les enzymes de la graine non germée.

L'action des autres effecteurs sur les enzymes des graines germées est à peu près identique à celle constatée dans l'étude des enzymes des graines non germées.

La germination semble avoir sensibilisé les phosphatases à l'action des effecteurs.

Enfin avec le fluorure il a été possible de provoquer une inhibition totale de la phytase, tandis que la monoestérase conserve une certaine activité.

CHAPITRE VI.

Etude des phosphatases du Seigle.

Essais de purification et de fractionnement.

Nous avons observé après divers auteurs que le Seigle se caractérise par son activité phytasique considérable. Après avoir étudié une graine à activité phytasique assez moyenne : le Radis, il nous a paru utile d'effectuer des essais analogues sur cette graine très active.

Nous décrirons tout d'abord les essais de fractionnement par précipitation et adsorption. Nous étudierons ensuite dans le chapitre suivant l'action des effecteurs.

a) PRÉCIPITATION ACÉTONIQUE.

Les enzymes ont été extraits par l'eau puis précipités par l'acétone en suivant la même technique que pour le Radis.

Avec cette préparation nous constatons que 1 cm³ de la solution à 1 p. 100 des enzymes de Seigle (obtenue après centrifugation) agissant sur le β glycérophosphate M/10 dans les conditions habituelles en libère 2,4 mg. de phosphore ; à partir de l'inositohexaphosphate, il y a libération de 0,8 mg. de phosphore. Une quantité double d'enzymes libère après 24 heures d'hydrolyse 4,4 mg. de phosphore à partir du β glycérophosphate et 1,9 mg. de phosphore à partir de l'inositophosphate.

Par contre, l'activité phytasique croît considérablement et devient même supérieure à l'activité phosphatasique lorsque l'on fait réagir 5 cm³ de la suspension diastasique sur les substrats, dans les conditions précédentes.

Le β glycérophosphate libère après 24 heures d'hydrolyse 5,85 mg. de phosphore et l'inositophosphate 6,15 mg.

Ce dernier résultat est intéressant parce qu'il est en rapport avec la supériorité phytasique observée lors de l'étude de la graine de Seigle (Tableau IV, p. 29).

La précipitation acétonique convient donc pour l'étude du Seigle et donne une préparation très active et propice aux essais de séparation.

b) RELARGAGE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM DES ENZYMES DE SEIGLE OBTENUS PAR PRÉCIPITATION ACÉTONIQUE.

Nous avons opéré exactement de la même manière que lors de l'étude du fractionnement des enzymes du Radis germé. Les mêmes prises d'essai ont été effectuées et les mêmes concentrations en sulfate d'ammonium ont été réalisées (Chapitre IV, p. 91). Nous avons néanmoins terminé cette étude en saturant de sulfate d'ammonium le liquide qui surnageait le précipité obtenu entre 50 et 66 p. 100 de saturation.

Nous avons déterminé les activités selon les procédés habituels et avons groupé nos résultats dans le tableau XXII.

Discussion des résultats.

Nous observons que les différentes fractions obtenues sont peu actives sauf la dernière obtenue par saturation totale du milieu en sulfate d'ammonium.

Le comportement des enzymes du Seigle diffère donc de celui des enzymes de Radis germé ou non, qui fournissaient par relargage des préparations très actives pour des concentrations en sulfate d'ammonium voisines de 66 p. 100.

Nous constatons à nouveau, mais ici avec un enzyme différent, que l'activité monoestérasique des premiers précipités est considérablement supérieure à leur activité phytasique. C'est seulement le dernier précipité (de 66 à 100 p. 100) qui hydrolyse plus rapidement l'inositohexaphosphate que le glycérophosphate.

TABLEAU XXII.

Activité monoestérasique et phytasique des enzymes de Seigle après fractionnements au sulfate d'ammonium.

Enzymes précipités entre les pourcentages suivants de saturation en sulfate d'ammonium	Substrats	
	$\frac{2}{5}$ Glycérophosphate M/40 5 cm ³ de suspension d'enzymes	Inositohexaphosphate M/40 5 cm ³ de suspension d'enzymes
0 à 5	1,05	1,05
5 à 33	0,45	0,05
33 à 50	0,40	0,05
50 à 66	1,3	0,7
66 à 100	2,2	3,5

Les deux derniers précipités obtenus à 65 p. 100 et à saturation totale sont particulièrement intéressants et seront utilisés pour les expériences d'adsorption ultérieures.

c) FRACTIONNEMENT AU MÉTHYLAL DE LA POUDRE D'ENZYMES DE SEIGLE PRÉCIPITÉE PAR L'ACÉTONE.

Nous avons utilisé la même technique opératoire que pour le Radis (p. 72).

Les mesures d'activité ont été effectuées quand cela a été possible avec 5 cm³ de solution diastasique à 2 p. 100 sur l'un ou l'autre des deux substrats.

L'addition de 15 p. 100 de méthylal refroidi à la solution d'enzymes à 2 p. 100 n'a fourni qu'un très faible précipité pesant 30 mg.

Nous pouvons remarquer néanmoins que le fractionnement au méthylal, tout comme le fractionnement au sulfate d'ammonium, fournit un premier précipité où l'activité phosphomonoestérasique est accrue par rapport à l'activité phytasique.

Des faits analogues avaient déjà été observés précédemment avec le Radis germé ou non germé.

TABEAU XXIII.

Activités monestérasique et phytasique des fractions obtenues par précipitation avec le méthylal.

Substrats	$\frac{3}{5}$ Glycérophosphate M/10 5 cm ³ suspension	Inositophosphate M/10 5 cm ³ suspension
1 ^{re} fraction 15 p. 100..	0,65 (1)	0,06
2 ^e fraction 66 p. 100..	1,9 (2)	5,6
3 ^e fraction acétone...	4,36 (2)	7,4

(1) Activité exprimée en mg. de P libérés par 5 cm³ d'une suspension diastasique à 0,2 p. 100.
 (2) Activité exprimée en mg. de P libérés par 5 cm³ d'une suspension diastasique à 1 p. 100.

Le deuxième précipité obtenu entre 15 et 66 p. 100 de concentration en méthylal renferme une phytase qui manifeste une bien plus grande activité que la monoestérase. Le rapport des activités ainsi obtenu est celui normalement constaté dans les graines de Seigle non traitées. Le dernier précipité obtenu avec le mélange méthylal/acétone donne un produit très actif sur les 2 substrats.

L'activité phytasique reste supérieure à l'activité phospho-

monoestérasique. Tout se passe là aussi comme si nous nous trouvions en présence d'un mélange de phosphomonoestérase banale et de phytosphatase. La phytosphatase précipitant après la monoestérase.

**Expériences d'adsorptions et de désorption
sur la poudre d'Enzyme de Seigle précipitée par l'acétone
puis relarguée par le sulfate d'ammonium.**

Les précipités obtenus par relargage au sulfate d'ammonium entre 50 et 66 p. 100 et entre 66 et 100 p. 100 de saturation préparés p. 101, ont été soumis à des essais d'adsorption et de désorption. Nous avons vu que ces précipités sont actifs et plus particulièrement celui obtenu de 66 à 100. Nous avons employé le même protocole opératoire indiqué p. 73 que pour les expériences sur le Radis et avons effectué les essais parallèlement sur les deux précipités. 5 cm³ de suspension à 0,7 p. 100 sont opposés aux substrats pendant 24 heures pour la fraction de 50 à 66 p. 100 et 48 heures pour celle de 66 à 100 p. 100.

Nos essais sont réunis dans le Tableau XXIV.

a) Terre d'infusoires.

L'adsorption a été médiocre, avec la fraction 50-66 l'adsorption est identique avec la monoestérase et la phytase. Sur la fraction 66 à 100 la terre d'infusoires n'a pratiquement pas fixé de phytase et seulement très peu de monoestérase.

b) Kaolin.

Le Kaolin n'a pas retenu de phytase de l'une ou l'autre des deux préparations.

Il n'a pas fixé de monoestérase du précipité 50-66 et une proportion infime de celle du précipité 66-100.

c) Alumine C₇.

L'Alumine C₇ de WILLSTÄTTER utilisée adsorbe moyennement les deux enzymes ; contrairement aux deux adsorbants précédents, l'alumine fixe plus fortement la phytase que la glycérophosphatase.

Nous avons déjà fait la même observation au sujet des enzymes du Radis,

d) *Alumine puis Kaolin.*

La fraction diastasique qui n'a pu être retenue sur l'Alumine a été moyennement fixée sur le Kaolin il faut noter que la monoestérase dans les deux cas a été davantage adsorbée que la phytase.

ELUTION PAR UNE SOLUTION AMMONIACALE.

Cet essai a été réalisé selon le protocole décrit p. 76.

Dans le cas des deux fractions nous constatons que la monoestérase a été élue médiocrement mais nettement tandis que

TABLEAU XXIV.

Activités monestérasique et phytasique des préparations d'enzymes de Seigle précipitées par l'acétone et relarguées par le sulfate d'ammonium, après adsorption et élution.

Origine de l'enzyme	Activité diastasique étudiée	Témoin Activité des enzymes avant adsorption	Pourcentage d'activité retenue par l'adsorbant				Elution par la solution ammoniacale
			Terre d'infusoires	Kaolin	Alumine C γ	Kaolin après alumine (3)	
			a	b	c	d	e
Fraction précipitée entre 50 et 66 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium obtenue page 101	Monoestérase .	0,9 (1)	27 (2)	0	55	87	0,05(1)
	Phytase .	0,9	27 (2)	0	88	50	traces
Fraction précipitée entre 66 et 100 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium obtenue page 101	Monoestérase .	2,7	14	16	66	22	0,9
	Phytase .	4,9	0	0	77	18	0

(1) Nombre de millig. de P libérés à partir des substrats respectifs.
 (2) Les chiffres du tableau représentent les pourcentages d'activité retenus par l'absorbant.
 (3) Pourcentage de l'activité persistant après action de l'Alumine, retenue par le Kaolin.

la phytase ne l'a pas été. Cette fixation énergique de la phytase déjà constatée lors de l'étude du Radis germé ou non, confirme l'affinité élevée et spécifique de l'Alumine C γ pour la phytase.

Cette différence de comportement vis-à-vis de la désorption

nous montre qu'à côté des différences chimiques constatées par ailleurs, la phytase se distingue de la monoestérase par son état physique.

Discussion des résultats.

Les essais d'adsorption et désorption sur deux préparations de Seigle à activité phytasique élevée par rapport à l'activité monoestérasique n'ont pas permis de séparer une fraction agissant sur le seul inositolphosphate. Tout au contraire nous avons obtenu une fois de plus un enzyme (élution par l'ammoniaque diluée) agissant sur le glycérophosphate mais dépourvu d'activité phytasique. La fixation variable des deux enzymes sur les divers adsorbants montre que dans le Seigle également, il existe au moins deux fractions phosphatasiques.

Il convient cependant de remarquer qu'à la différence du Radis la monoestérase du Seigle est parfois fixée plus fortement par les adsorbants que la phytase.

Nous avons déjà indiqué que lorsque deux substances adsorbables de façon voisine sur le même adsorbant se trouvent en contact avec ce dernier c'est la substance dont la concentration est la plus faible dans le milieu qui présente le pourcentage d'adsorption le plus élevé.

Le Seigle se différenciant des autres graines par son activité phytasique considérable il est à présumer que la phytase s'y trouve en proportion plus importante que la monoestérase associée. Avec les autres graines (Radis, Moutarde-blanche), c'est au contraire l'inverse qui se produit.

Il n'est donc pas surprenant qu'à l'inverse de ces graines, le Seigle renferme une phosphomonoestérase dont le pourcentage d'adsorption est supérieur à celui de la phytase.

Conclusions. — Les essais de fractionnement par précipitation ou adsorption des enzymes du Seigle n'ont pas permis d'obtenir de préparations actives sur le seul inositolphosphate. Nous avons obtenu des fractions à activité phytasique élevée par comparaison à nos résultats antérieurs avec le Radis. Toutes les fractions à forte activité phytasique possédaient également une activité monoestérasique importante.

Par contre, il a encore été possible de séparer quelques fractions hydrolysant le β glycérophosphate mais dépourvues d'ac-

tion sur l'inositophosphate. Il apparaît donc indiscutable que le Seigle renferme au moins deux fractions phosphatasiques. Tous nos résultats sont en faveur de l'existence dans les graines de Seigle d'une phytosphatase associée à une phospho-monoestérase banale.

CHAPITRE VII.

Action de divers effecteurs physiques et chimiques sur les Phosphatases du Seigle.

a) Essai de séparation des deux enzymes par inactivation thermique.

Nous avons également déterminé l'action des effecteurs sur le Seigle.

Nous avons utilisé la même technique opératoire que lors des études précédentes du Radis ayant germé ou non. Nous avons utilisé la préparation obtenue par extraction aqueuse et précipitation acétonique.

Les prises d'essai correspondent à 5 cm³ de la suspension d'enzymes à 1 p. 100 dans l'eau toluénée et la durée d'hydrolyse est ici de 48 heures.

TABLEAU XXV.

*Inactivation thermique de la poudre d'enzymes de Seigle
précipités par l'acétone.*

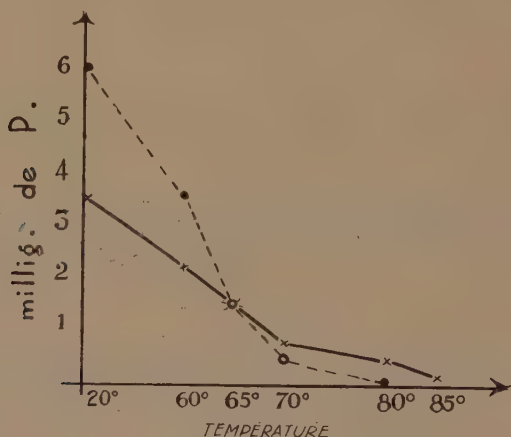
Température de l'essai		20°	60°	65°	70°	80°	85°
Activité relative	Monoestérase ..	100 (1)	62	44	25	14	10
	Phytase	100	51	25	8	0	0

(1) 100 représentent l'activité du témoin non chauffé. Ce dernier a libéré 3,65 mg. de phosphore du glycérophosphate et 6,20 millig. de l'inositophosphate.

Nous voyons que le chauffage à 80° inactive totalement la phytase du Seigle. Cette dernière est plus thermolabile que celle du Radis. Cette fragilité permet de la rapprocher de l'enzyme du Blé, FLEURY et COURTOIS [27].

Après les enzymes de Blé, de la Moutarde, du Radis, ceux du Seigle montrent une fois de plus que la phytase est inactivée par la chaleur avant la monoestérase. L'inactivation thermique fractionnée fournit avec les quatre graines étudiées une

préparation dont la phytase est pratiquement inactivée d'une façon totale, alors que la monoestérase associée conserve une faible activité.



Courbes d'inactivation thermique des enzymes de Seigle.

Abscisses : température.

Ordonnées : Mg. de P libérés.

——— Traits pleins : Activité phosphomonoestérasique.

----- Traits pointillés : Activité phytasique.

b) Action de divers effecteurs chimiques sur la poudre d'Enzymes de Seigle précipités par l'acétone.

La technique opératoire utilisée est la même qui nous a servi à l'étude de la graine de Radis germé ou non (voir p. 83).

Fluorure de Sodium.

Le fluorure de sodium n'exerce d'action inhibitrice nette qu'à partir d'une concentration 2.10^{-3} M dans le milieu. Cette action inhibitrice est sensiblement identique sur les deux substrats.

Sulfocyanate d'ammonium.

Ce sel exerce une très nette action activatrice, elle est particulièrement élevée avec la monoestérase, elle se montre même supérieure à celles observées sur d'autres phosphatases végétales par COURTOIS et BOSSARD [16]. L'activation de la monoestérase est supérieure à celle de la phytase.

TABEAU XXVI.

Activités monoestérasique et phytasique de la suspension d'enzymes de Seigle à 1 p. 100 obtenus par précipitation acétonique, en présence de divers effecteurs.

Concentration moléculaire de l'effecteur dans le milieu rationnel		2.10 ⁻⁴	4.10 ⁻⁴	1.10 ⁻³	2.10 ⁻³	4.10 ⁻³	1.10 ⁻²	2.10 ⁻²	3.10 ⁻²	4.10 ⁻²
Nature de l'effecteur	Activité relative (1)									
Fluorure de sodium	Monoestérase ..	100			100	65	47		17	
	Phytase	100			100	52	35		17	
Sulfocyanate d'ammonium	Monoestérase ..						100	152		169
	Phytase						133	205		226
Cyanure de potassium	Monoestérase ..				94		94	94	94	
	Phytase				147		147	176	176	
Oxalate d'ammonium	Monoestérase ..				176		143	95		87
	Phytase				260		231	182		173
Chlorure de calcium	Monoestérase ..		105	105	123	123				
	Phytase		100	100	121	125				
Sulfate de magnésium	Monoestérase ..		136	149	117	117				
	Phytase		153	127	127	127				
Sulfate de zinc	Monoestérase ..		95	70	55	41				
	Phytase		47	40	35	21				

(1) Dans les essais témoins le β glycérophosphate a libéré 8,5 mg. de P et l'inositophosphate en a libéré 11,5 mg.

Cyanure de potassium.

La monoestérase est inhibée d'une façon insignifiante, par contre la phytase est activée d'une façon importante.

Oxalate d'ammonium.

A de faibles concentrations il active l'hydrolyse du glycérophosphate, mais à partir d'une concentration 2.10^{-2} M, il l'inhibe faiblement.

Par contre, la phytase est activée considérablement, cette activation diminue lorsque la concentration en oxalate augmente.

Chlorure de calcium.

L'ion calcium ne provoque qu'une minime activation des deux enzymes.

Sulfate de magnésium.

Il active également de façon modérée les deux enzymes.

Sulfate de zinc.

C'est un inhibiteur des deux enzymes, son action apparaît être plus marquée sur la phytase.

DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS

FOURNIS PAR LES EFFECTEURS SUR LES ENZYMES ÉTUDIÉS.

Il nous est maintenant possible de comparer l'action des divers effecteurs chimiques sur les phosphatases des graines.

Les recherches portent en effet sur un certain nombre de graines : Blé, FLEURY et COURTOIS [27] ; Moutarde-Blanche, COURTOIS [13, 14] et enfin au cours de ce travail : Radis germé ou non germé et Seigle.

1) FLUORURE DE SODIUM.

Il a inhibé d'une façon extrêmement nette aussi bien la monoestérase que la phytase.

Pour des concentrations égales en effecteur, la monoestérase est un peu plus sensible à l'inhibition que la phytase avec la Moutarde-Blanche et le Radis non germé ou germé. Il n'existe pas de différences appréciables pour le Seigle et le Blé. Par contre l'enzyme de Radis non germé additionné d'oxalate puis dia-

lysé présente une activité phytasique bien plus sensible à l'inhibition fluorée que la monoestérase associée.

Cependant dans l'ensemble les écarts sont peu accentués et nous pouvons conclure que le fluorure de sodium est un inhibiteur énergique de la phosphomonoestérase II et de la phytase II.

2) SULFOCYANATE D'AMMONIUM.

Ce sel, à des concentrations élevées pour un effecteur, inhibe faiblement la phytase de Blé, plus nettement celles de Moutarde et du Radis germé ; pratiquement sans action sur le Radis non germé ; Il exerce par contre une très nette activation de la phytase du Seigle.

Le sulfocyanate inhibe très faiblement l'hydrolyse du glycérophosphate par la Moutarde et le Radis germé, demeure pratiquement sans action sur le Radis non germé, active faiblement le Blé et nettement le Seigle.

COURTOIS et BOSSARD [16] avaient déjà noté l'irrégularité des comportements de diverses phosphatases II de graines vis à vis de cette action du sulfocyanate.

Nos résultats confirment leurs recherches. Il est probable que le sulfocyanate agit par « effet de sel » en modifiant le degré d'agrégation ou de dispersion des micelles diastasiques d'où son irrégularité d'action selon l'origine de l'enzyme.

Nous ne retiendrons de l'action du sulfocyanate que le fait suivant : presque toujours cet effecteur influence de façon distincte l'hydrolyse du glycérophosphate et de l'inositophosphate. Ce fait apporte un argument complémentaire à l'existence d'au moins deux systèmes phosphatasiques distincts.

3) CYANURE DE POTASSIUM.

Cet effecteur a inhibé nettement la phytase du Radis non germé, d'une façon assez minime celle du Radis germé, par contre il active notablement celle du Seigle. De telles différences ne s'observent pas avec la monoestérase. Le cyanure pratiquement sans effet sur l'hydrolyse du glycérophosphate par le Radis germé, inhibe faiblement celle réalisée par le Seigle et un peu plus nettement celle provoquée par le Radis non germé. Il paraît assez difficile de tirer des déductions au sujet de la phytase ; le nombre de préparations diastasiques étudiées étant trop peu élevé. Le plus souvent l'action du cyanure

sur les enzymes est attribuée au blocage d'un élément métallique soit indispensable à l'activité de l'enzyme (inhibition des enzymes ferro ou cuproprotéidiques) soit au contraire entravant l'action de l'enzyme (activation de la papaïne par blocage du cuivre). Il nous paraît fort prématuré et très hasardeux de prétendre que le cyanure a bloqué un élément métallique nécessaire à l'activité de la phytase du Radis et un élément métallique, soit identique, soit beaucoup plus probablement différent, qui entravait l'action de la phytase du Seigle. D'autres essais sur des phytases différentes sont indispensables pour étayer de semblables interprétations. Il est d'ailleurs possible que dans le cas du Seigle le cyanure exerce une activation en tant que sel alcalin comme le fait le sulfocyanate.

Un seul fait précis est à déduire de nos essais, la nette différence de comportement de la phytase et de la monoestérase en présence de cyanure, ce qui fournit un nouvel argument en faveur de l'existence de deux systèmes phosphatasiques distincts.

4) OXALATES ALCALINS.

Ils fournissent des résultats un peu analogues à ceux obtenus par l'étude du cyanure. Les oxalates de sodium et ammonium inhibent nettement les phytases du Radis germé ou non germé. L'enzyme additionné d'oxalate puis dialysé est également très sensible à l'inhibition. COURTOIS [14] n'avait pas observé d'inhibition appréciable de la phytase purifiée de Moutarde-blanche. Par contre l'oxalate d'ammonium active d'une façon considérable la phytase du Seigle. L'oxalate d'ammonium inhibe en général faiblement la monoestérase sauf dans le cas du Seigle où nous observons tout d'abord une activation qui se transforme en inhibition pour de plus fortes doses d'effecteur. Dans le Chapitre III de la III^e Partie (page 86) nous avons réalisé quelques essais en vue de préciser le mode d'action inhibitrice de l'anion oxalique sur les enzymes du Radis. Les faits observés permettent d'envisager que cet anion forme avec l'enzyme une combinaison inactive dissociable ; il convient de remarquer que les arguments en faveur de cette hypothèse ne sont pas décisifs, nous pouvons seulement retenir qu'ils sont plus favorables à cette hypothèse qu'à celle de la précipitation d'un élément métallique indispensable à l'activité de l'enzyme. L'action activatrice inattendue observée avec le

Seigle paraît délicate à interpréter, l'action favorable de l'oxalate en temps que sel alcalin paraît être la plus vraisemblable. Il convient en effet de remarquer que les enzymes activés (Seigle) ou inhibés (Radis germé) par le sulfocyanate d'ammonium le sont également par l'oxalate.

Ainsi l'action mal définie de l'oxalate se rapprocherait de celle encore très imprécise des sels alcalins comme le sulfocyanate.

Toutefois, l'action de l'oxalate comme effecteur permet une fois de plus de constater que les hydrolyses de l'inositohexaphosphate et du glycérophosphate sont influencées d'une façon souvent qualitativement et toujours quantitativement différente par cet effecteur.

5) CHLORURE DE CALCIUM.

L'oxalate ne paraît pas intervenir en précipitant le calcium qui pouvait être nécessaire à l'activité de l'enzyme, la phosphatase de Radis, traitée par l'oxalate et dialysée n'est pas activée par le chlorure de calcium.

Par ailleurs, cet effecteur n'exerce qu'une action activatrice ou inhibitrice minime aussi bien sur la phytase que sur la monoestérase des diverses graines.

6) SULFATE DE ZINC.

C'est avec le fluorure de sodium l'effecteur qui a fourni les résultats les plus homogènes.

Qualitativement inhibition des phytases et monoestérases étudiées. Quantitativement, par rapport aux autres effecteurs, les inhibitions observées ne sont pas très différentes aussi bien entre les diverses préparations qu'entre la phytase et la monoestérase.

Ainsi dans l'ensemble les effecteurs ont apporté de nouveaux arguments nets en faveur de l'existence d'une phytosphatase et d'une phosphomonoestérase banale distinctes.

Par contre, si le fluorure de sodium et le sulfate de zinc sont des inhibiteurs énergiques de ces deux enzymes, les autres effecteurs ont exercé une action très irrégulière.

Les écarts les plus notables ont été observés avec le cyanure et l'oxalate. Doit-on envisager dans les graines l'existence de plusieurs types de phytases distincts comme celle du Radis et

celle du Seigle, nos essais devraient être étendus à d'autres graines avant de prendre position.

Conclusions. — L'étude des effecteurs sur les phosphatases du Seigle fournit de nouveaux arguments en faveur de l'existence de deux systèmes phosphatasiques distincts.

Nous avons procédé à un examen détaillé suivi de discussion des résultats fournis par action des divers effecteurs chimiques sur les phosphatases de graines.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Nous avons cherché à préciser nos connaissances sur les propriétés de la phytase, enzyme peu répandu et assez mal connu, mais qui présente un grand intérêt physiologique par suite de la très forte proportion d'inositophosphates dans les constituants phosphorés des végétaux.

1) Nous avons tout d'abord tenté de caractériser des sources de phytase relativement actives.

Dans ce but, nous avons déterminé l'activité phytasique d'un grand nombre de graines ; il a été possible de constater que la plupart des graines ne présentaient qu'une activité phytasique minime. Les graines de Blé et Seigle, sont de beaucoup les plus riches en phytase de celles expérimentées. L'activité phytasique des Blés durs est supérieure à celle des Blés tendres.

Il n'existe pas de rapport entre l'activité phytasique d'une part et d'autre part soit l'origine botanique de la graine, soit son caractère huileux ou amylicé, soit l'activité de la glycérophosphatase associée, soit enfin sa teneur en phosphore orthophosphorique ou inositohexaphosphorique. Pour ces recherches nous avons mis au point une technique nouvelle de détermination des inositophosphates dans les graines.

Quelques essais réalisés avec diverses feuilles nous ont montré que leur activité phytasique était très minime.

2) N'ayant pu déceler de sources très actives de phytase en dehors de celles déjà connues : Blé et Seigle, nous avons tenté de provoquer l'élaboration de phytase par des organismes.

Il n'a pas été possible de provoquer l'élaboration de phytase en tant qu'enzyme d'adaptation par cultures répétées de *Aspergillus niger* sur un milieu nutritif dont l'inositophosphate représentait la seule source de phosphore.

Par contre, la germination des graines s'accompagne d'une nette augmentation de leur activité phytasique. Nous avons étudié cet accroissement d'une façon détaillée avec les graines

de Radis. La phytase qui apparaît sous forme active au cours de la germination ne semble pas préexister dans la graine au repos sous forme inactive liée à des protéines.

Nous avons constaté au cours de ces essais que les enzymes protéolytiques, pepsine et papaïne, n'exercent qu'une action inactivante relativement minime sur les phosphatases des graines de Radis et Seigle.

3) Nous avons cherché à préciser la spécificité et les propriétés de deux phytases de graines, celle du Radis ayant subi ou non une germination et celle du Seigle non germé. Dans l'ensemble nos recherches confirment l'hypothèse émise par P. FLEURY et J. COURTOIS pour interpréter le comportement des phosphatases du son de Blé ; hypothèse confirmée ensuite par J. COURTOIS avec la Moutarde-blanche et qui est la suivante :

Les graines étudiées renferment au moins deux fractions phosphatasiques distinctes.

a) Une *phosphomonoestérase banale* susceptible d'hydrolyser un certain nombre de monoesters phosphoriques comme les glycérophosphates, cet enzyme est par contre pratiquement sans action sur l'inositohexaphosphate.

b) Une *phytophosphatase*, phosphatase à champ d'action étendu susceptible d'hydrolyser à la fois l'inositohexaphosphate et le glycérophosphate.

Le relargage fractionné par le sulfate d'ammonium ou la précipitation fractionnée par les solvants organiques (méthylal-acétone) nous ont montré qu'avec les graines de Radis et Seigle la monestérase banale se retrouvait dans les premières fractions précipitées. La phytophosphatase apparaît ensuite dans les échantillons précipités soit avec une plus forte salinité du milieu, soit pour une concentration plus élevée du solvant organique.

Les essais de purification par adsorption ont montré que les deux fractions phosphatasiques étaient inégalement retenues par les adsorbants.

Des préparations phosphatasiques d'une haute activité furent séparés au cours de ces deux essais.

Parmi les nombreuses fractions étudiées certaines se sont révélées actives sur le seul glycérophosphate et n'ont pu hydrolyser l'inositohexaphosphate.

Par contre toutes les préparations actives sur l'inositohexa-

phosphate ont manifesté une nette activité hydrolysante sur le glycérophosphate.

Au cours de l'inactivation thermique progressive, les phytophosphatases du Seigle et du Radis sont totalement inactivées à des températures où la monoestérase banale conserve encore une légère action sur le glycérophosphate. L'action des effecteurs chimiques sur les deux fractions phosphatasiques a confirmé leur indépendance. La phosphomonoestérase banale et la phytophosphatase sont fortement inhibées par les fluorures ou les sels de zinc. Elles réagissent par contre d'une façon nettement différente avec d'autres effecteurs : sulfocyanate d'ammonium, cyanure de potassium, oxalate d'ammonium.

L'action inhibitrice des oxalates alcalins sur la phytophosphatase du Radis ne paraît pas provenir d'une précipitation d'ions calcium ou magnésium nécessaires à l'activité de l'enzyme. Le diastase additionnée d'oxalate puis dialysée demeure sensible à l'inhibition oxalique et n'est pas activée par les ions calcium et magnésium. Dans l'ensemble nos recherches confirment donc que la phytophosphatase est un enzyme peu répandu et distinct des phosphomonoestérases banales.

Vu : le Président de la Thèse,
PAUL FLEURY.

Paris, le 29 mars 1949

Le Doyen,
RENÉ FABRE.

Vu et permis d'imprimer :
Paris, le 31 mars 1949.
Le Recteur de l'Académie de Paris
Président du Conseil de l'Université,
JEAN SARRAILH.

BIBLIOGRAPHIE.

1. ABRAMSON (E.) dans BIGWOOD (E.) Enseignements de la guerre 1939-1945 dans le domaine de Nutrition. — Masson édit., 1947, p. 325.
2. ADLER (L.). — *Biochem. Zeitschr.* — 1915, 70, 1 et 1916, 75, 319.
3. ALBAUM (H.) et UMBREIT (W.). — *Amer J. Bot.*, 1943, 30, 553.
4. AXELROD (B.). — *J. Biol. Chem.*, 1947, 167, 57.
5. BERNARDINI (L.) et MORELLI (G.). — *Atti di R. Acad. Lincei*, 1912, 21, 357.
6. BOSSARD (M.). — *Th. Doct. Univ. Pharm.*, Paris 1946.
7. BOWERS (R.V.), OUTHOUSE (E.L.) et FORBES (J.C.). — *J. Biol. chem.*, 1940, 132, 675.
8. COLIN (Y.). — *Th. Doct. Sc.*, Paris, 1935.
9. COURTOIS (J.). — *IV^e Congrès Chim. Biol.*, n° spécial 1934, p. 388.
10. COURTOIS (J.). — *Th. Doct. Sc. phys.*, Paris, 1938.
11. COURTOIS (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.* 1945, 27, 411.
12. COURTOIS (J.). — *Biochim. et Biophys. Acta*, 1947, 1, 270.
13. COURTOIS (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, 29, 944.
14. COURTOIS (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1948, 30, 37.
15. COURTOIS (J.) et BIGET (P.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, 25, 103.
16. COURTOIS (J.) et BOSSARD (M.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1945, 27, 406.
17. COURTOIS (J.) et JOSEPH (G.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, 29, 951.
18. COURTOIS (J.) et JOSEPH (G.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1948, 30, 610.
19. COURTOIS (J.) et MANOUVRIER (M^{lle} J.). — *Enzymologia* 1939, 6, 342.
20. COURTOIS (J.) et PLUMEL (M.). — *Actual. Biochim. du Professeur Florkin*, 1947, 10, 81.
21. COURTOIS (J.) et RECOULES (A.). — *Inositophosphates et Phytases (à l'impression)*.
22. COVELLO (M.). — *Boll. Soc. Ital. biol. sperim.*, 1943, 18, 158.
23. DOX (A. W.). — *J. biol. Chem.*, 1911, 10, 77.
24. DOX (A. W.) et GOLDEN (R.). — *J. biol. Chem.*, 1911, 10, 183.
25. ECHEVIN (R.). — *Rev. Gen. Bot.*, 1936, 48, 505.
26. FLEURY (P.) et COURTOIS (J.). — *Enzymologia*, 1937, 1, 377.
27. FLEURY (P.) et COURTOIS (J.). — *Biochim. et Biophys. acta*, 1947, 1, 256.
28. FLEURY (P.) et COURTOIS (J.). — *Les Diastases*, A. Colin Edit., 1948,

29. GIRI (K. V.) et SREENIVASAN (A.). — *Biochem. Zeitschr.*, 1938, 296, 428.
30. HÉRISSEY (H.). — *Th. Doct. Univ. Pharm.*, Paris, 1899.
31. HESSE (A.). — *Ergebn. Enzymforsch.*, 1934, 3, 110.
32. HOFF-JÖRGENSEN (E.) dans BIGWOOD (E.). — Enseignements de la guerre 1939-1945 dans le domaine de la Nutrition. Masson Edit., 1947, 304.
33. HOFF-JÖRGENSEN (E.) et PORSDAL (V.). — *Trans. Dan. Acad. Techn-Sc.*, 1947, n^o 2, 5.
34. HORIUCHI (K.). — *J. Biochem. Japan*, 1931, 14, 163.
35. IWANOFF (L.). — *Ber. deut. Bot. Ges.*, 1902, 20, 366.
36. JEGOROW (M. A.). — *Biochem. Zeitschr.*, 1914, 61, 41.
37. JOSEPH (G.). — *Th. Doct. Univ. Pharm.*, Paris, 1948.
38. KARSTRÖM (H.). — *Ergebn. Enzymforsch.*, 1938, 7, 350.
39. KREIGER (C. H.). — *Th. Sc. Univ. Wisconsin*, 1938.
40. LOWE (J. T.) et STEENBOCK (H.). — *Biochem. Jl.*, 1936, 30, 1126.
41. LÜERS (H.) et SILBEREISEN (K.). — *Wschr für Brauerei*, 1927, 44, 263.
42. MAC-CANCE (R.) et WIDDOWSON (E.). — *Biochem. Jl.*, 1935, 29, 2694.
43. MAC-CANCE (R.) et WIDDOWSON (E.). — *Nature*, 1944, 153, 650.
44. MAC-COLLUM (E. V.) et HART (E. B.). — *J. biol. Chem.*, 1908, 4, 497.
45. MARTLAND (M.), HANSMAN (F. S.) et ROBISON (R.). — *Biochem. Jl.*, 1924, 18, 1152.
46. MELLANBY (E.). — *Nature*, 1944, 154, 394.
47. MESTREZAT (E.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1914-1919, 1, 107.
48. MICHEL-DURAND (E.). — *Bull. Soc. chim. biol.*, 1938, 20, 413.
49. MICHEL-DURAND (E.). — Le phosphore des Végétaux, 1, Phosphore minéral et glucidique, Presses Universitaires de France, 1939.
50. MIYAGAWA (K.). — *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 1936, 12, 74.
51. MÖLLGAARD (H.), LORENZEN (K.), HANSEN (I.), et CHRISTENSEN (P.). — *Biochem. Jl.*, 1946, 40, 589.
52. NAGANNA (B.) et NARAYANA MENON (V. K.). — *J. Biol. Chem.*, 1948, 174, 517.
53. NGUYEN VAN THOAI. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, 23, 1186.
54. NGUYEN VAN THOAI. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, 24, 1077.
55. NGUYEN VAN THOAI. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1942, 24, 1369.
56. PATWARDHAN (V. N.). — *Biochem. Jl.*, 1937, 31, 560.
57. PFANKUCH (E.). — *Z. physiol. Chem.*, 1936, 241, 34.
58. PLIMMER (R. H.). — *Biochem. Jl.*, 1913, 7, 43.
59. PLUMEL (M.). — *Th. Doct. Univ. Pharm.*, Paris 1948.
60. POSTERNAK (S.) et POSTERNAK (T.). — *Helv. Chim. Acta.*, 1929, 12, 1165.
61. RAPOPORT (S.), LEVA (E.) et GUEST (G. M.). — *J. Biol. chem.*, 1941, 139, 621.
62. RAPOPORT (S.), LEVA (E.) et GUEST (G. M.). — *J. Cell. and compar. physiol.*, 1942, 19, 103.
63. ROCHE (J.). — *Actual. Biochim. du Professeur Florkin*, Masson édit., 1947, 10, 76.
64. ROCHE (J.) et COURTOIS (J.). — *Exposés ann. Biochim. Med.*, Masson édit., 1944, 4, 259.
65. SHIMODA (C.). — *Centrabl. f. Bakteriöl and Parasitenkrank, und Infektionskrank*, 1927, 71, 232.
66. SPITZER (R.) et PHILLIPS (P.). — *J. Nutr.*, 1945, 30, 183.

67. STARKENSTEIN (E.). — *Biochem. Zeitschr.*, 1910, 30, 56.
68. SUMI (M.). — *Biochem. Zeitschr.*, 1928, 195, 161.
69. SUZUKI (V.), YOSHIMURA (K.) et TAKAISHI (M.). — *Bull. Coll. Agric. Tokio*, 1907, 7, 503.
70. TURCK (E. E. de), HOLBERT (J. R.) et HOWK (B. W.). — *J. Agr. Res.*, 1933, 46, 121.
71. ZLATAROFF (A.). — *Biochem. Zeitschr.*, 1916, 75, 200.
-

TABLE DES MATIÈRES.

INTRODUCTION	7
Généralités sur la Phytase	11

PREMIÈRE PARTIE.

Activité phytasique de diverses graines et feuilles

CHAPITRE I. — Description des techniques analytiques utilisées	23
CHAPITRE II. — Teneur en inositophosphates et activité phytasique de diverses graines	28
CHAPITRE III. — Teneur en inositophosphates et acti- vité phytasique de quelques variétés de Blé	32
CHAPITRE IV. — Activité phytasique de quelques feuilles.	35

DEUXIÈME PARTIE.

Recherches en vue d'obtenir des matières premières dont l'ac- tivité phytasique a été artificiellement accrue

INTRODUCTION	41
CHAPITRE I. — Cultures répétées de <i>l'Aspergillus</i> sur un milieu renfermant de l'inositophosphate	43
CHAPITRE II. — Influence de la germination sur le déve- loppement de l'activité phytasique	48
CHAPITRE III. — Action de la pepsine et de la papaïne sur la glycérophosphatase et la phytase des graines.	54

TROISIÈME PARTIE.

Etude particulière de deux phytases de graines

INTRODUCTION	63
CHAPITRE I. — Essais de purification et de fractionne- ment des phosphatases du Radis non germé	65
CHAPITRE II. — Action de divers effecteurs sur les phos- phatases du Radis non germé	78

CHAPITRE III. — Recherches en vue de préciser le mode d'action inhibitrice des oxalates sur les phosphatases du Radis non germé	86
CHAPITRE IV. — Essais de purification et de fractionnement des phosphatases du Radis soumis à la germination	90
CHAPITRE V. — Action de divers effecteurs physiques et chimiques sur les phosphatases du Radis germé ..	95
CHAPITRE VI. — Etude des phosphatases du Seigle. — Essais de purification et de fractionnement	100
CHAPITRE VII. — Action de divers effecteurs physiques et chimiques sur les phosphatases du Seigle	107
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	115
BIBLIOGRAPHIE	119

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

L'HYALURONIDASE.

